

Nachweis und ökologische Evaluation des klimarelevanten
Metaboliten Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)
in Phytoplankton und Meerwasser

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Chemikerin (Umweltchemie) Astrid Spielmeyer

geboren am 5. Juli 1983 in Ostercappeln

Gutachter

1. Prof. Dr. Georg Pohnert

Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

2. Prof. Dr. Rainer Beckert

Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3. Dr. Michael Steinke

Department of Biological Sciences, University of Essex

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. Mai 2011

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Plankton.....	1
1.2 Biosynthese und Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP).....	2
1.3 Bedeutung von DMSP und Dimethylsulfid (DMS)	5
1.4 Analyse von DMSP	7
2 Zielstellung.....	9
3 Methodenentwicklung	10
3.1 Analyse von DMSP als Pyrenylmethyl-Ester (DMSP-PDAM)	10
3.1.1 Probenvorbereitung	10
3.1.2 Methodvalidierung	11
3.2 Analyse von DMSP mittels HILIC.....	16
3.3 Analyse von DMSP mittels ZIC-HILIC.....	21
3.4 Analyse von DMSP in Meerwasser-Proben	24
4 DMSP und andere Osmolyten im Phytoplankton.....	29
4.1 Vergleich der direkten und indirekten DMSP-Bestimmung	29
4.2 Analyse weiterer DMS-Vorstufen	31
4.3 Analyse anderer Osmolyten.....	34
5 DMSP-Gehalt im Verlauf einer Zellkultur.....	37
5.1 Bisherige Studien.....	37
5.2 Ergebnisse und Diskussion	39
5.2.1 Allgemeine Parameter	39
5.2.2 DMSP im Tagesverlauf.....	42
5.2.3 Einfluss der Stickstoff-Verarmung und Wachstumsphase auf die DMSP-Produktion der Zelle.....	46
5.2.4 Weitere DMS-Vorstufen	50
6 DMSP-Aufnahme im Phytoplankton	52
6.1 Bisherige Studien.....	52
6.2 Ergebnisse und Diskussion	53
7 Einfluss des Klimawandels.....	58
7.1 Einleitung.....	58
7.2 Experimentelles Design	60
7.3 Ergebnisse und Diskussion	61

7.3.1	Allgemeine Parameter.....	62
7.3.2	Vorbetrachtungen.....	66
7.3.3	GBT.....	67
7.3.4	DMSP.....	71
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	80
9	Experimenteller Teil.....	83
9.1	Geräte.....	83
9.2	Datenauswertung.....	83
9.3	Analysenmethoden.....	83
9.3.1	UPLC/MS Methode – Derivatisierte Proben.....	83
9.3.2	UPLC/MS-Methode – HILIC.....	84
9.3.3	HPLC/MS-Methode – ZIC-HILIC.....	85
9.3.4	GC/MS-Methode.....	86
9.4	Synthesen.....	86
9.4.1	Synthese von DMSP, D ₆ -DMSP und ¹³ C ₂ D ₆ -DMSP.....	86
9.4.2	Synthese weiterer DMS-Vorstufen.....	87
9.4.3	Synthese von Pyrenyldiazomethan (PDAM).....	88
9.5	Phytoplankton-Kulturen.....	89
9.5.1	Kultivierung.....	89
9.5.2	Medien.....	90
9.6	Freilanduntersuchungen.....	90
9.6.1	Probennahme in der Ostsee.....	90
9.6.2	Probennahme bei Mesokosmos-Studien.....	90
9.7	Probenvorbereitung.....	91
9.7.1	Filtration.....	91
9.7.2	Derivatisierung.....	91
9.7.3	HILIC.....	92
9.7.4	ZIC-HILIC.....	92
9.7.5	Anreicherung von DMSP mittels ZIC-HILIC-SPE.....	92
9.7.6	Indirekte Bestimmung über DMS.....	93
9.8	Methodenvergleich.....	93
9.9	DMSP- und GBT-Analytik.....	94
9.10	DMSP-Gehalt im Verlauf einer Zellkultur.....	95
9.10.1	Kultivierung.....	95
9.10.2	Probennahme.....	95
9.10.3	Zellzählung und Volumenbestimmung.....	96
9.10.4	<i>In vivo</i> Fluoreszenz und Nährstoffanalytik.....	96
9.10.5	DMSP-Produktionsrate.....	96
9.10.6	Statistik.....	97
9.11	Aufnahme von DMSP.....	97
9.11.1	Aufnahme in verschiedenen Phytoplankton-Kulturen.....	97
9.11.2	Kinetik.....	97
9.12	Einfluss des Klimawandels.....	98
9.12.1	Kultivierung.....	98

9.12.2	Versuchsdesign.....	99
9.12.3	Einfluss von Klimaveränderungen	100
9.12.4	Probennahme	100
9.12.5	Zellteilungsrate, Volumenbestimmung und pH-Wert.....	100
9.12.6	<i>In vivo</i> Fluoreszenz.....	101
9.12.7	Elektronenmikroskop-Aufnahmen	101
9.12.8	Statistik.....	101
LITERATURVERZEICHNIS		102
Anhang		114

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Globale Chlorophyll-Konzentration.....	1
Abb. 1.2: Algenblüte vor der Küste von Norwegen.....	2
Abb. 1.3: Biosynthese von DMSP in marinen Algen.	3
Abb. 1.4: Biogeochemischer Kreislauf von DMSP und DMS.....	4
Abb. 1.5: Spaltung von DMSP zu DMS und Acrylsäure durch die DMSP-Lyase.....	5
Abb. 1.6: Funktionen von DMS bei Interaktionen im marinen Nahrungsnetzwerk.	6
Abb. 1.7: Einige natürlich vorkommende Dimethylsulfonium-Verbindungen als mögliche DMS-Vorstufen.....	7
Abb. 1.8: Derivatisierung des DMSP mit PDAM.....	8
Abb. 3.1: (A) LC/MS-Chromatogramm eines derivatisierten Zellextraktes von <i>Skeletonema costatum</i> (B) Massenspektrum und (C) UV-Spektrum einer derivatisierten Standardlösung	12
Abb. 3.2: Ionenspur der HILIC-LC/MS-Analyse einer 100 nmol L ⁻¹ DMSP-Lösung (A) ohne Seewasser-Zusatz und (B) mit 40 µL Seewasser	18
Abb. 3.3: Ionenspuren der HILIC-LC/MS-Analyse von (A) Blindwert, (B) D ₆ -DMSP-Lösung, (C) DMSP-Standardlösung und (D) Methanol-Extrakt von <i>Skeletonema costatum</i>	19
Abb. 3.4: Massenspektrum im Bereich des internen Standards D ₆ -DMSP für (A) die HILIC-Methode und (B) die ZIC-HILIC-Methode	22
Abb. 3.5: Kalibrationsfunktion der ZIC-HILIC-Messung	23
Abb. 3.6: Anreicherung von DMSP aus Meerwasser mittels ZIC-HILIC-SPE.....	27
Abb. 3.7: Anreicherung von DMSP aus Meerwasser mittels ZIC-HILIC-SPE; (A,D) 80%, (B,E) 70%, (C,F) 60% organisches Lösungsmittel.....	27
Abb. 4.1: Ionenspuren der UPLC-Trennung verschiedener DMS-Vorstufen (A) nach Derivatisierung mit PDAM und (B) mittels HILIC	32
Abb. 4.2: Ionenspuren der UPLC-Trennung verschiedener Osmolyten mittels ZIC-HILIC.....	32
Abb. 4.3: (A) Ionenspuren der PDAM-Derivate von DMSP und Gonyol (10fach vergrößert) in einer Kultur von <i>E. huxleyi</i> (RCC 1216); (B) MS/MS des nicht derivatisierten Gonyols in <i>E. huxleyi</i> (RCC 1217).....	33
Abb. 4.4: (A) Ionenspuren von DMSP und DMS-Acetat (5fach vergrößert); (B) MS/MS-Spektrum von DMS-Acetat; Daten aufgenommen auf ZIC-HILIC mit einer Kultur von <i>P. minimum</i>	34
Abb. 4.5: Analyse von GBT und DMSP in verschiedenen Kulturen von <i>T. pseudonana</i> (A) als PDAM-Derivate, (B) mittels HILIC, (C) mittels ZIC-HILIC.....	35
Abb. 5.1: Allgemeine Parameter der <i>Skeletonema marinoi</i> batch-Kulturen.....	40

Abb. 5.2: Entwicklung von DMSP im Tagesverlauf in der exponentiellen und frühen stationären Phase.	43
Abb. 5.3: DMSP-Produktionsraten für N+ und N- Kulturen.....	47
Abb. 5.4: Zellzahlen und DMSPp pro Liter Medium für N+ und N- Kulturen.....	49
Abb. 5.5: Verlauf einer Algenblüte von <i>S. marinoi</i> im Rahmen einer Mesokosmos-Studie im Vergleich zu DMSPp und Nitrat.....	50
Abb. 5.6: Vergleich der direkten und indirekten DMSP-Bestimmung für N+ und N- Kulturen..	51
Abb. 6.1: Aufnahme von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP durch verschiedene Phytoplankton-Kulturen.....	53
Abb. 6.2: Mögliche Aufnahmewege von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP in die Zelle.....	54
Abb. 6.3: Aufnahmemechanismus von DMSP.....	54
Abb. 6.4: Kinetik der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Aufnahme in <i>E. huxleyi</i>	56
Abb. 6.5: Kinetik der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Aufnahme in <i>T. weissflogii</i>	56
Abb. 7.1: Einfluss einer schrittweisen Temperatur-Gewöhnung von <i>T. pseudonana</i> auf DMSP- und GBT-Gehalt der Zelle.....	61
Abb. 7.2: GBT-Gehalt pro Zelle in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>T. pseudonana</i>	68
Abb. 7.3: GBT-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>P. tricornutum</i>	68
Abb. 7.4: GBT-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>E. huxleyi</i> (nicht-kalzifizierend).....	69
Abb. 7.5: GBT-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>E. huxleyi</i> (kalzifizierend).....	70
Abb. 7.6: DMSP-Gehalt pro Zelle in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>T. pseudonana</i>	71
Abb. 7.7: DMSP-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>P. tricornutum</i>	72
Abb. 7.8: DMSP-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>E. huxleyi</i> (nicht-kalzifizierend).....	74
Abb. 7.9: DMSP-Gehalt pro Zelle und intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO_2 -Gehalt in <i>E. huxleyi</i> (kalzifizierend).	75
Abb. 7.10: Elektronenmikroskop-Aufnahmen für <i>E. huxleyi</i> (kalzifizierend).....	77
Abb. 9.1: Syntheschema für 4-DMS-2-methoxybutyrat.....	87
Abb. 9.2: (A) Versuchsdesign für Vorstudien mit <i>T. pseudonana</i> (Einfluss schrittweise Akklimatisierung).....	99

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3.1: Vergleich einiger Methodenparameter der Bestimmung von DMSP nach Derivatisierung mittels LC/MS mit der etablierten indirekten Methoden (GC)	16
Tab. 4.1: DMSP-Zellgehalte im Phytoplankton ermittelt anhand von UPLC/MS und GC/MS ...	29
Tab. 4.2: DMSP- und GBT-Gehalte in marinen Phytoplankton-Kulturen	36
Tab. 7.1: Absolute und relative Zellteilungsraten (d^{-1})	63
Tab. 7.2: Zellvolumen (μm^3)	64
Tab. 7.3: <i>In vivo</i> Fluoreszenz in Bezug auf Zellzahl (10^3)	65
Tab. 7.4: pH-Wert des jeweiligen Kulturmediums	66
Tab. 7.5: Allgemeine Trends für die Entwicklung von GBT in den jeweiligen Behandlungen ...	67
Tab. 7.6: Allgemeine Trends für die Entwicklung von DMSP in den jeweiligen Behandlungen	67
Tab. 9.1: Gradient für die Analyse von DMSP-PDAM	84
Tab. 9.2: Gradient für die Analyse von DMSP (HILIC)	84
Tab. 9.3: Gradient für die Analyse von DMSP (ZIC-HILIC)	85
Tab. 9.4: Phytoplankton-Kulturen, Filtrationsvolumen und Kultivierungstemperaturen für Methodenvergleich	93
Tab. 9.5: Phytoplankton-Kulturen und Filtrationsvolumen für DMSP- und GBT-Analytik	94

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

amu	atomare Masseneinheit
AU	absorbance units
BG	Bestimmungsgrenze
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
CCMP	Center for Culture of Marine Phytoplankton
CCN	Wolkenkondensationskeime (cloud condensation nuclei)
CDCl_3	deuteriertes Chloroform
Chl a	Chlorophyll a
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff (dissolved inorganic carbon)
DMS	Dimethylsulfid
DMS-Acetat	Dimethylsulfoniumacetat
DMS-2-MP	3-Dimethylsulfonium-2-methylpropionat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSP	Dimethylsulfoniumpropionat
DMSPd	gelöstes Dimethylsulfoniumpropionat
DMSPp	partikuläres Dimethylsulfoniumpropionat
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
GBT	Glycinbetain
GC/MS	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor
HILIC	Hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HS-GC	Dampfraum (Headspace)-Gaschromatographie
IS	interner Standard
MSD	massenselektiver Detektor
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NP	Normalphase
NWG	Nachweisgrenze
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PDAM	Pyrenyldiazomethan
RCC	Roscoff Culture Collection

rel. Int.	relative Intensität
RSD	relative Standardabweichung (relative standard deviation)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
SAG	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen
SAMS	Scottish Association for Marine Science
SCX	starker Kationenaustauscher (strong cation exchanger)
SMM	S-Methylmethionin
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise)
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction)
THF	Tetrahydrofuran
ToF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (Time of Flight)
UPLC/MS	Ultraleistungsflüssigchromatographie mit massenselektivem Detektor
WCX	schwacher Kationenaustauscher (weak cation exchanger)
WFR	Wiederfindungsrate
ZIC-HILIC	Zwitterionen-Chromatographie / Hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie

1 Einleitung

1.1 Plankton

Der Begriff Plankton (griechisch planktos: das Umherirrende) beschreibt im Wasser lebende Organismen, deren Fortbewegung allein durch Wasserströmungen bestimmt wird. Einzellige, photoautotrophe Lebewesen werden als Phytoplankton bezeichnet. Phytoplankton ist weltweit im aquatischen Ökosystem präsent, was anhand von Satelliten gestützter Chlorophyll-Messungen gezeigt werden kann (Abb. 1.1). Weltweit gehen ca. 46% der Sauerstoff- und Primärproduktion auf Phytoplankton zurück, was damit einen ähnlichen Beitrag wie die terrestrischen Pflanzen liefert (FIELD *et al.* 1998, FUHRMAN 2003).

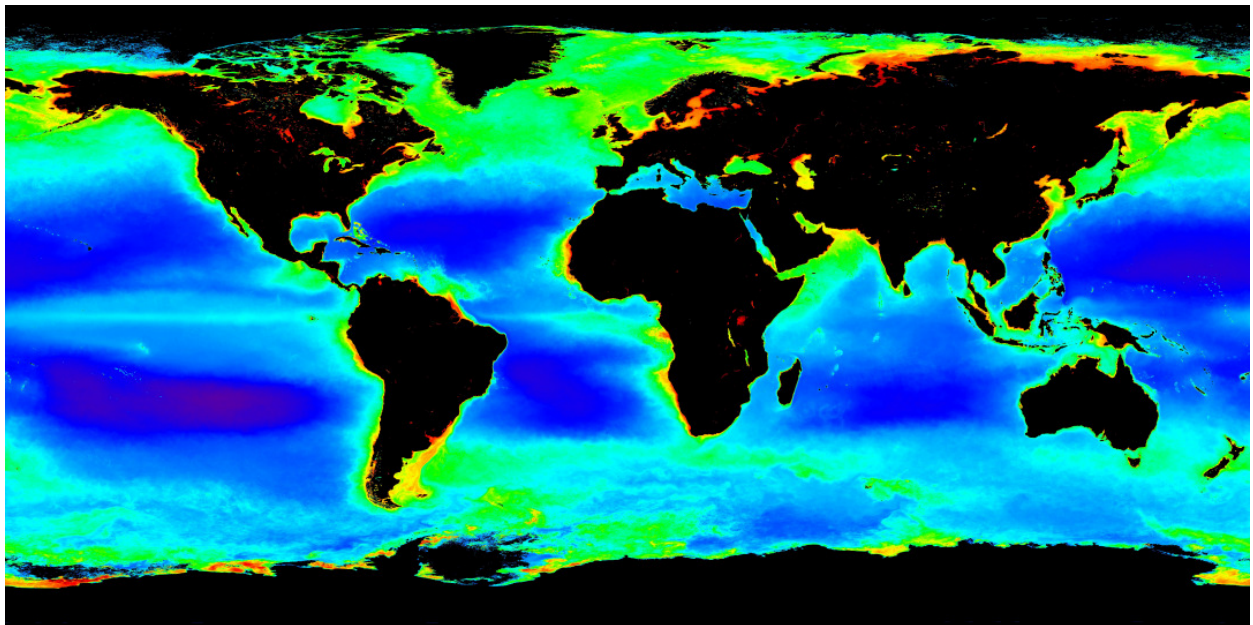


Abb. 1.1: Globale Chlorophyll-Konzentration (Aufnahmen vom 1. Juli 2002 bis 31. Dezember 2004, Auflösung 4 km); rote Flächen zeigen hohe, violette Flächen niedrige Chlorophyll-Konzentration (Quelle: www.nasa.gov).

Phytoplankton besteht aus mikroskopischen Organismen, die unter anderem in Kieselalgen (Diatomeen), Cyanobakterien (Blualgen), Dinoflagellaten oder Grünalgen aufgeteilt werden. Diese Organismen leben meist unscheinbar im aquatischen Ökosystem. Unter bestimmten Bedingungen kann es aber zu einer exponentiellen Vermehrung einer oder weniger Spezies kommen, die dann für kurze Zeit das umgebende Ökosystem dominieren. Das Phänomen wird als Algenblüte bezeichnet und kann auch auf Satellitenbildern beobachtet werden (Abb. 1.2).

BOYCE *et al.* (2010) ermittelten anhand von Chlorophyll-Daten der letzten Jahrzehnte, dass die Menge des Phytoplanktons weltweit pro Jahr um knapp 1% abgenommen hat. Seit 1950 wurde

ein Rückgang von 40% verzeichnet. Die Abnahme fand vor allem in den Polar- und Tropenregionen sowie im offenen Ozean statt. Langzeitbeobachtungen von Plankton zeigen weiter, dass in den letzten Jahrzehnten Verschiebungen der Artenzusammensetzungen im marinen Ökosystem stattgefunden haben (HAYS *et al.* 2005). So konnte im Nordatlantik beobachtet werden, dass Arten aus Warmwasser-Gebieten sich Richtung Norden ausbreiten. Gleichzeitig ziehen sich Kaltwasser-Arten weiter zurück. Derartige Verschiebungen bleiben oftmals nicht auf das Plankton beschränkt, sondern setzen sich in weiteren trophischen Ebenen fort (BEAUGRAND und REID 2003, HAYS *et al.* 2005).

Phytoplankton bildet die Grundlage des marinen Nahrungsnetzwerkes und besitzt damit eine Schlüsselstellung im marinen Ökosystem (HARDY 1959, LINK 2002). So ist zum Beispiel die Primärproduktion des Phytoplanktons der limitierende Faktor in der Fischerei (CHASSOT *et al.* 2010). Faktoren, die Artenzusammensetzung und Menge des Phytoplanktons beeinflussen, wirken sich somit auf das gesamte Nahrungsnetzwerk aus.

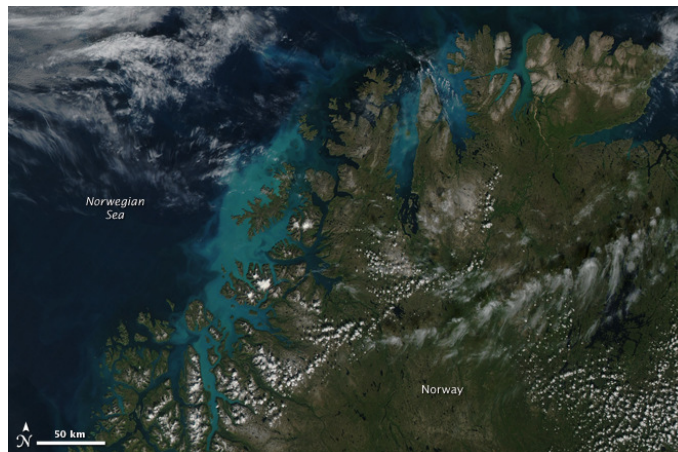


Abb. 1.2: Algenblüte vor der Küste von Norwegen (Aufnahme vom 4. August 2009, Quelle: <http://earthobservatory.nasa.gov>); türkise Verfärbungen zeigen Vorkommen von Phytoplankton.

1.2 Biosynthese und Abbau von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)

Neben dem Phytoplankton selbst bilden auch dessen Stoffwechselprodukte eine wichtige Grundlage für andere marine Organismen. Eine bedeutende Rolle spielt dabei Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP), das von Phytoplankton, Makroalgen und anderen Wasserpflanzen synthetisiert wird. Es wirkt intrazellulär als Antioxidans und Kryoprotektivum und dient zur Regulierung des osmotischen Drucks (KIRST *et al.* 1991, SUNDA *et al.* 2002, YOCH 2002). DMSP kann bis zu 16% des Gesamtkohlenstoffes im Phytoplankton ausmachen (KIENE *et al.* 2000). Die Biosynthese erfolgt ausgehend von der Aminosäure Methionin (Abb. 1.3) (STEFELS 2000).

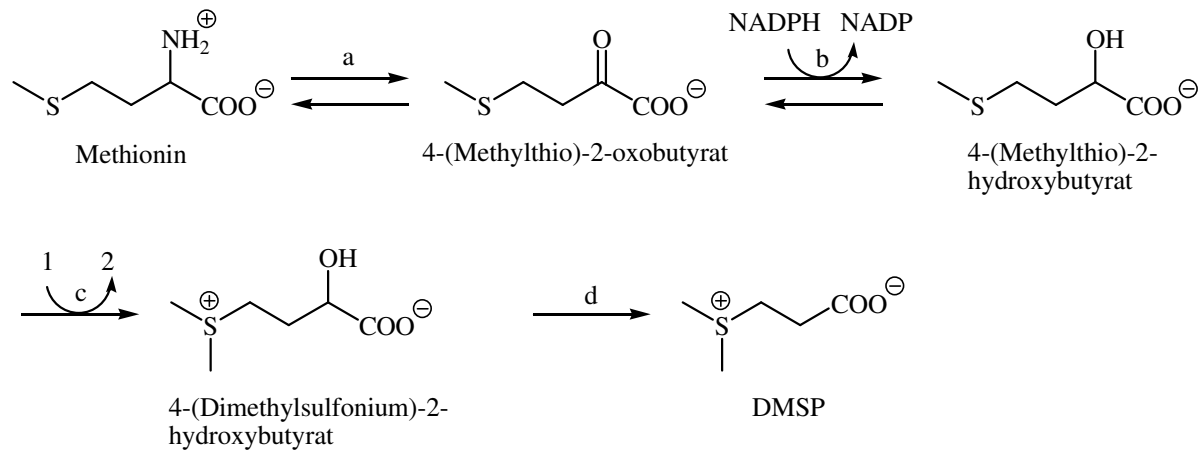


Abb. 1.3: Biosynthese von DMSP in marinen Algen (nach STEFELS 2000 in Anlehnung an GAGE *et al.* 1997); (a) Transaminierung, (b) Reduktion, (c) Methylierung mit (1) S-Adenosylmethionin, das selbst zu (2) S-Adenosylhomocystein reagiert, (d) oxidative Decarboxylierung; NADPH/NADP Nicotinamadenindinukleotidphosphat in der reduzierten bzw. oxidierten Form.

In höheren Pflanzen findet die DMSP-Synthese über andere Zwischenprodukte statt. Methionin wird im ersten Schritt zu S-Methylmethionin methyliert. Dies wird durch Transaminierung und Demethylierung (Zwischenprodukte bisher nicht nachgewiesen) in 3-Dimethylsulfoniumpropional überführt. Durch eine Oxidation wird DMSP erhalten (STEFELS 2000).

DMSP kann von den Produzenten in das Seewasser abgegeben werden. Der Austritt erfolgt durch Ausscheidung, nach Schädigung der Membran oder als Antwort auf bakterielle oder virale Infektion (STEFELS *et al.* 2007). DMSP hätte im sterilen Seewasser eine chemische Halbwertszeit von über 8 Jahren (DACEY und BLOUGH 1987). Extrazellulär ist DMSP jedoch labil, da es innerhalb kurzer Zeit von anderen Organismen aufgenommen oder enzymatisch abgebaut wird.

In gelöster Form stellt DMSP extrazellulär eine wichtige Kohlenstoff- und Schwefelquelle für heterotrophe Lebewesen dar. DMSP und seine Abbauprodukte tragen bis zu 15% zu dem Kohlenstoffbedarf von marinen Bakterien bei und decken nahezu 100% ihres Schwefelbedarfs ab (KIENE und LINN 2000, STEFELS *et al.* 2007). DMSP spielt somit eine wichtige Rolle im pelagischen Nahrungsnetzwerk (YOCH 2002, STEFELS *et al.* 2007, KIENE *et al.* 2000).

Es existieren mehrere biotische Abbauewege für DMSP (Abb. 1.4). Welcher Weg bevorzugt wird, hängt von unterschiedlichen Faktoren ab wie zum Beispiel Stratifikation, Temperatur, Nährstoffsituation, Belastung durch UV-Strahlung oder auch der vorliegenden DMSP-Konzentration (SIMÓ und PEDRÓS-ALIÓ 1999, KIENE und LINN 2000, STEFELS *et al.* 2007). Aber auch die Konzentration anderer Osmolyte wie zum Beispiel Glycinbetain (GBT) kann einen Einfluss haben (KIENE *et al.* 1998).

Demethylierung und anschließende Abspaltung von Methanthiol sind die favorisierten biotischen Abbaureaktionen. Studien mit radioaktiven ^{35}S -DMSP in Meerwasser haben gezeigt, dass über 80% des extrazellulären DMSP zu Methanthiol abgebaut wurden. Ungefähr 10% wurden zu Dimethylsulfid (DMS) umgewandelt (KIENE und LINN 2000).

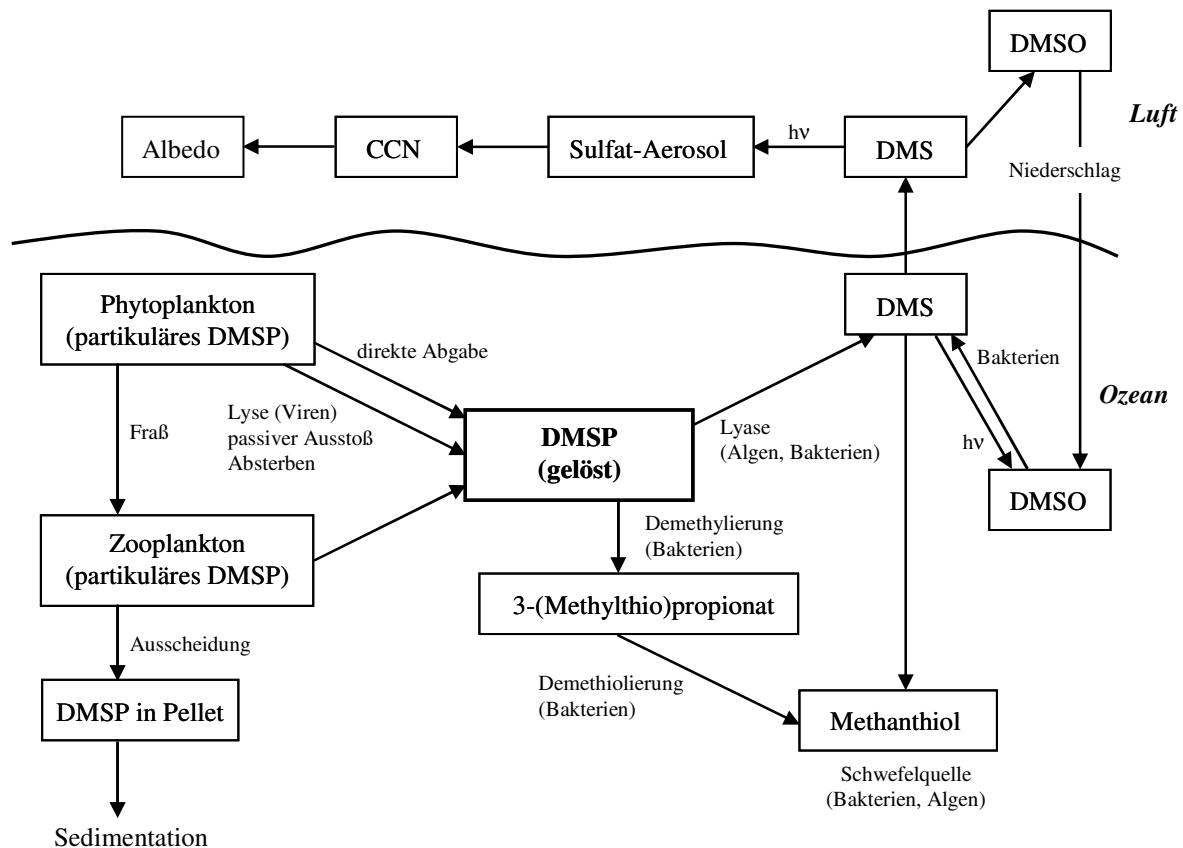


Abb. 1.4: Biogeochemischer Kreislauf von DMSP und DMS (gekürzte Fassung nach KIENE *et al.* (2000); CCN – Wolkenkondensationskeime).

Methanthiol wird von marinen Bakterien unter anderem für die Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren verwendet (KIENE *et al.* 2000). Die Aufnahme reduzierter Schwefelverbindungen wie Methanthiol ist für Organismen energetisch günstiger als die Verwendung des in höheren Konzentrationen vorliegenden Sulfats (Konzentrationsunterschied Faktor 10^7) (GENG und BELAS 2010). Es wird vermutet, dass Bakterien wie z.B. *Roseobacter* Biofilme auf Phytoplankton ausbilden, um unmittelbaren Zugang zu ausgeschiedenen organischen Verbindungen wie DMSP zu erhalten (GENG und BELAS 2010).

Der biotische Abbau von DMSP zu DMS wird durch das Enzym DMSP-Lyase katalysiert. Als zweites Produkt entsteht Acrylsäure (bzw. deren dissoziierte Form) (Abb. 1.5). In intakten Organismen-Zellen liegen Substrat und Enzym isoliert voneinander vor (WOLFE und STEINKE 1996). Die DMSP-Lyase kann sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vorliegen (DE SOUZA *et*

al. 1996, STEFELS und DIJKHUIZEN 1996, WOLFE und STEINKE 1996). Die Enzymaktivität kann dabei innerhalb einer Art stark variieren (STEINKE *et al.* 1998, NIKI *et al.* 2000). Das Vorkommen des Enzyms ist nicht an die Produktion von DMSP gebunden. Eine DMSP-Lyase-Aktivität wurde auch bei heterotrophen Lebewesen wie den Bakterien *Alcaligenes* sp. und *Pseudomonas doudoroffii* gefunden (YOCH *et al.* 1997).

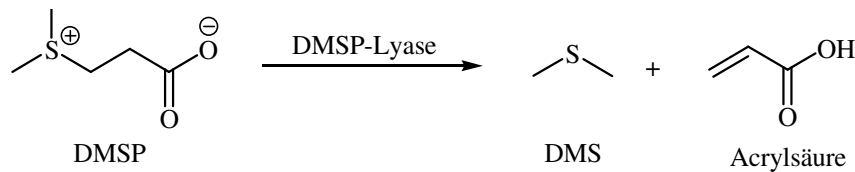


Abb. 1.5: Spaltung von DMSP zu DMS und Acrylsäure durch die DMSP-Lyase.

Ein weiterer Abbauweg von DMSP zu DMS wurde von TODD *et al.* (2007) beschrieben. Aus Bakterien des Stammes *Marinomonas* konnte ein Gen (dddD) isoliert werden, das für die Bildung von DMS erforderlich ist. Wurde dieses Gen in *Escherichia coli* übertragen, so konnte das Bakterium bei Zugabe von DMSP auch DMS produzieren. In diesem Fall wurde anstelle von Acrylsäure 3-Hydroxypropionat als zweites Spaltungsprodukt vorgeschlagen. Mit einem aus dem Bakterium *Roseovarius nubinhibens* isolierten Gen (dddP) konnte *E. coli* DMSP zu DMS und Acrylsäure abbauen (KIRKWOOD *et al.* 2010).

Die von KIENE und LINN (2000) ermittelte Verteilung zwischen den verschiedenen DMSP-Abbauwegen mit bevorzugter Demethylierung/ Demethiolierung wurde für Meerwasserproben außerhalb einer Blütesituation ermittelt. Während einer Algenblüte kann das Verhältnis der Abbauwege verstärkt in die Richtung der Lyase-Spaltung verschoben sein. VAN DUYL *et al.* (1998) ermittelten während einer Blüte des DMSP-Produzenten *Phaeocystis*, dass bis zu 50% des DMSP zu DMS und Acrylsäure abgebaut wurden. Die Struktur des vorliegenden mikrobiellen Netzwerkes beeinflusst somit den Anteil der jeweiligen Abbauwege.

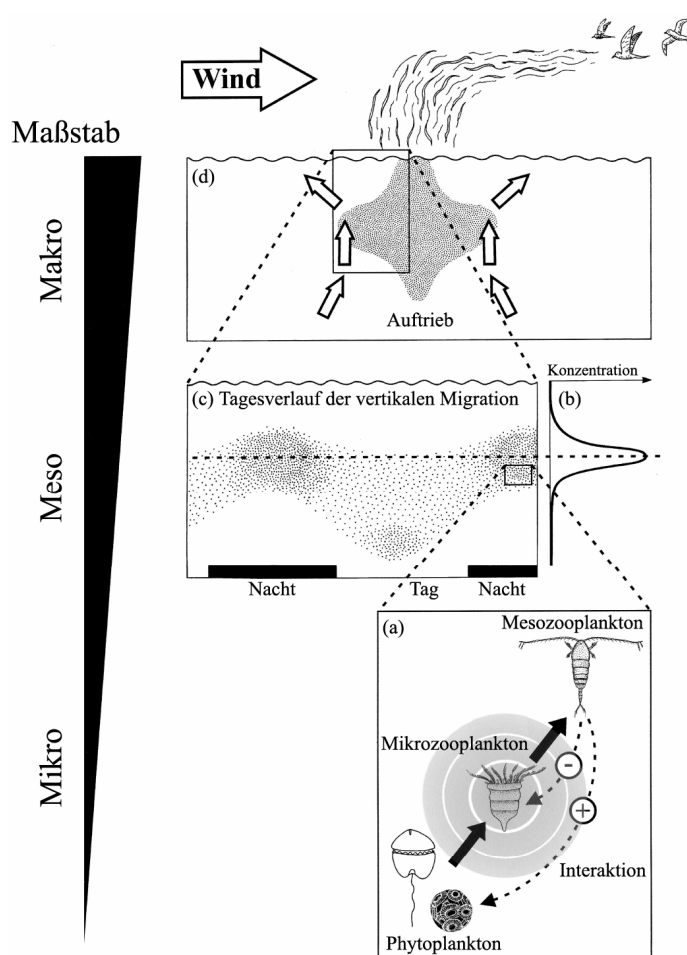
Darüber hinaus spielt die Situation der Freisetzung eine entscheidende Rolle. Bei Beschädigung der Zellwand, zum Beispiel durch Herbivoren, werden in kurzer Zeit hohe Mengen DMSP freigesetzt. Eine hohe DMSP-Konzentration fördert die Bildung von DMS (KIENE und LINN 2000 und enthaltene Referenzen), eventuell durch eine Induktion der DMSP-Lyase (DE SOUZA und YOCH 1995).

1.3 Bedeutung von DMSP und Dimethylsulfid (DMS)

Neben der Bedeutung als Kohlenstoff- und Schwefelquelle besitzen DMSP und das Abbauprodukt DMS weitere wichtige Funktionen. So konnte anhand der Braunalge *Dictyota*

dichotoma gezeigt werden, dass eine Verwundung der Zellen zu einer vermehrten Bildung von DMS und Acrylat führt. Eine Mischung dieser zwei Komponenten und des ebenfalls freigesetzten Trimethylamins führte zu einer verminderten Nahrungsaufnahme der Herbivoren in Bioassays mit *Amphithoe longimana* (WIESEMEIER *et al.* 2007). Die DMSP-Spaltung ist damit Teil der aktivierten Verteidigung von Algen. STROM *et al.* (2003) zeigten, dass Protisten allein von DMSP in ihrem Fraßverhalten beeinflusst werden können. DMS und Acrylsäure zeigten keine Wirkung. Die Verbindungen wurden aber separat getestet und nicht wie von WIESEMEIER *et al.* (2007) als Mischung. Somit könnten synergetische Effekte in der Abwehr von Phytoplankton eine Rolle spielen.

Sowohl DMSP als auch DMS wirken darüber hinaus als Infochemikalie. So nutzen zum Beispiel planktivore Fische DMSP zum Auffinden ihrer Beute (DEBOSE *et al.* 2008). DMS beeinflusst als



Infochemikalie die Wechselwirkungen zwischen Jäger und Beute über mehrere trophische Ebenen hinweg. Durch Interaktionen zwischen Phytoplankton und Mikrozooplankton (zum Beispiel Fraß und somit Verwundung der Zelle) wird DMS freigesetzt, das sich um das Mikrozooplankton anreichert. Carnivores Mesozooplankton nutzt dies zum Aufspüren seiner Beute (Mikrozooplankton) (Abb. 1.6 a). DMS beeinflusst dadurch die Migration des Mesozooplanktons (Abb. 1.6 b und c). Die DMS-Emissionen der Ozeane werden von verschiedenen pelagischen Seevögeln als Hinweise auf Nahrungsvorkommen verwendet (Abb. 1.6 d) (STEINKE *et al.* 2002).

Abb. 1.6: Funktionen von DMS bei Interaktionen im marinen Nahrungsnetzwerk (nach STEINKE *et al.* 2002).

Das in die Atmosphäre abgegebene DMS stellt eine wichtige Verbindung im globalen Schwefelkreislauf dar. Die DMS-Emissionen der Ozeane betragen 13 bis 37 Tg Schwefel pro Jahr, was bezogen auf die Ozeane 90% und weltweit 50% der natürlichen Schwefelemissionen

entspricht (KETTLE and ANDREAE 2000). Neben seiner Funktion als Infochemikalie besitzt DMS in der Atmosphäre auch eine klimarelevante Wirkung. Die durch Oxidation aus DMS gebildeten Sulfatschwebstoffe dienen als Kondensationskeime für die Wolkenbildung (BATES *et al.* 1987, CHARLSON *et al.* 1987). Studien haben gezeigt, dass die auf DMS zurückgehenden Partikel zu den wichtigsten Quellen für Kondensationskeime zählen. Aufgrund ihrer Größe besitzen diese Partikel eine hohe Verweildauer in der Atmosphäre (detaillierte Ausführungen in SHAW 1987). Wolken haben einen Einfluss auf die Strahlungsbilanz der Erde. Die These, DMS könne damit dem anthropogenen Treibhauseffekt entgegenwirken, konnte jedoch bislang nicht bewiesen werden.

1.4 Analyse von DMSP

DMS kann neben einer enzymatischen Spaltung auch durch Einwirkung starker Basen aus DMSP freigesetzt werden (DACEY und BLOUGH 1987). Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Quantifizierung von DMSP nutzen diesen Sachverhalt aus. Der DMSP-Gehalt wird indirekt über den DMS-Gehalt ermittelt. Hierbei kommt die Gaschromatographie mit massenselektivem oder flammenphotometrischem Detektor zum Einsatz (HOWARD *et al.* 1998, SMITH *et al.* 1999, NIKI *et al.* 2004, YANG *et al.* 2005). Ein Grundproblem bei allen indirekten Methoden besteht darin, dass DMS potentiell auch aus anderen biogenen Vorstufen freigesetzt werden kann. Derartige Vorstufen wurden in den letzten Jahren zum Beispiel in Rotalgen und Dinoflagellaten nachgewiesen (Abb. 1.7) (SCIUTO *et al.* 1982, NAKAMURA *et al.* 1992, NAKAMURA *et al.* 1993, PATTI *et al.* 1993, GAGE *et al.* 1997). Die Quantifizierung von DMSP über DMS kann somit zu der Ermittlung eines zu hohen Gehaltes führen. In physiologischen Untersuchungen würde unter Umständen nicht eine Veränderung von DMSP, sondern die anderer DMS-Vorstufen untersucht und interpretiert werden.

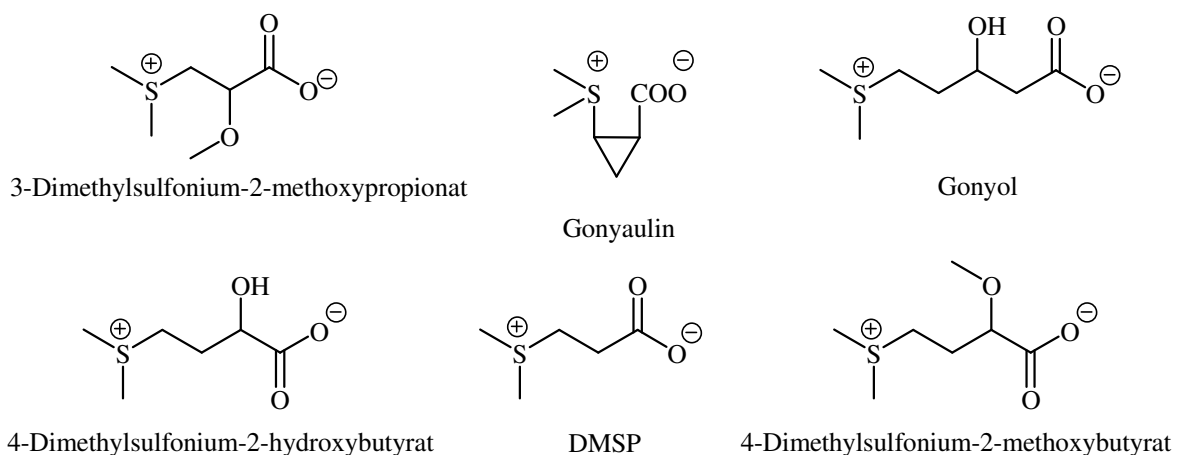


Abb. 1.7: Einige natürlich vorkommende Dimethylsulfonium-Verbindungen als mögliche DMS-Vorstufen.

Aufgrund seiner zwitterionischen Struktur kann DMSP mit Hilfe einer Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) nur schlecht von anderen Matrixbestandteilen abgetrennt werden. Störungen aufgrund von Koelution mit Verunreinigungen können nur durch eine aufwendige Probenvorbereitung verringert werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen stellt hier die Ionenchromatographie dar (GORHAM 1984). Doch auch dieses Verfahren sieht eine umfangreiche Probenvorbereitung vor (GORHAM 1984, COLMER *et al.* 2000), so dass sich die HPLC bislang nicht für die Analyse von DMSP etabliert hat. ZHANG *et al.* (2005) entwickelten eine Methode auf Basis der Kapillarelektrophorese. Eine Zitationsanalyse ergab, dass diese Methode bisher noch keinen Einzug in die Routineanalytik gefunden hat. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Kapillarelektrophorese bislang keine Standardanalysetechnik darstellt. Parallel zu den in dieser Dissertation vorgestellten Arbeiten entwickelten LI *et al.* (2010) eine Methode zur Analyse von Betainen und DMSP in Korallen, die eine Trennung der Verbindungen auf einer Pentafluorophenylpropyl-Säule vorsieht. Nachteilig bei der beschriebenen HPLC-Methode ist die Verwendung eines ternären Gradienten.

WIESEMEIER und POHNERT (2007) entwickelten eine Methode zur Analyse von DMSP in Makroalgen mit Hilfe der HPLC oder UPLC mit massenselektivem Detektor (HPLC/MS bzw. UPLC/MS). Im Rahmen der Probenvorbereitung wird DMSP mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) derivatisiert (Abb. 1.8), so dass der Analyt eine Absorption bei einer höheren Wellenlänge aufweist. Durch den Pyrenyl-Rest wäre eine selektive Detektion mit UV- oder Fluoreszenz-Detektor möglich. Darüber hinaus erlaubt der Pyrenyl-Rest die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und ermöglicht eine Trennung der Verbindung auf einer RP-Säule in der HPLC oder UPLC.

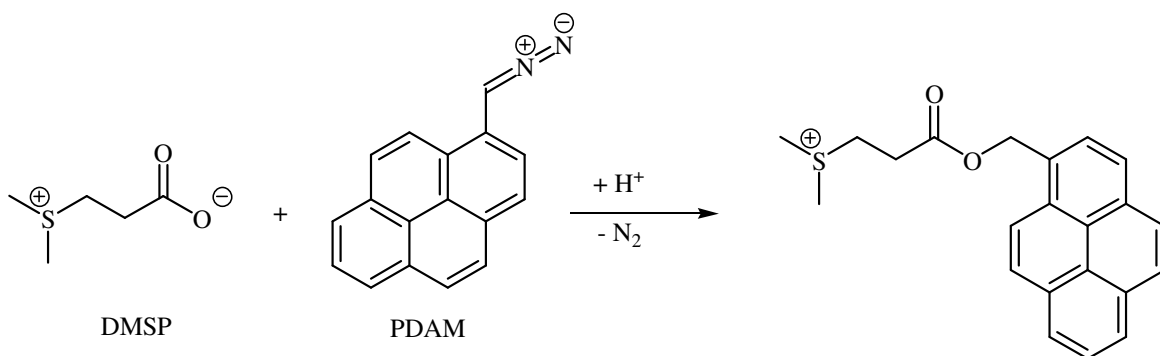


Abb. 1.8: Derivatisierung des DMSP mit PDAM.

2 Zielstellung

Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) gilt als zentraler Metabolit im marinen Ökosystem. Sowohl für ein besseres Verständnis von Interaktionen im Plankton und zwischen verschiedenen trophischen Ebenen als auch für das Verständnis von geochemischen Prozessen ist es wichtig, diesen Metaboliten direkt analysieren zu können. Nur so können Aussagen über DMSP allein und nicht über die Gesamtheit von DMS-Vorstufen insgesamt getroffen werden. Hier setzt die vorliegende Arbeit mit folgenden zentralen Aspekten an:

- WIESEMEIER und POHNERT (2007) zeigten, dass die Derivatisierung von DMSP mit PDAM prinzipiell auch auf die Analyse von Mikroalgen übertragen werden kann. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Methode für die Quantifizierung von DMSP in planktonischen Algen zu optimieren und zu validieren. Zusätzlich wurde die hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie (HILIC) für die DMSP-Analytik getestet. Dieses Verfahren würde eine Analyse ohne vorherige Derivatisierung ermöglichen.
- Anhand der neuen Methode (Derivatisierung mit PDAM) sollte ein Vergleich der direkten und indirekten DMSP-Bestimmung vorgenommen werden. Damit sollte überprüft werden, ob andere DMS-Quellen in Planktonproben vorhanden sind, die das Ergebnis der indirekten Bestimmung verfälschen.
- DMSP gilt als das schwefelhaltige Gegenstück zu dem stickstoffhaltigen Osmolyten Glycinbetain (GBT). Unter nitratlimitierten Bedingungen wird ein Ersatz von GBT durch DMSP diskutiert. Anhand der Diatomee *Skeletonema marinoi* (G4) sollte untersucht werden, wie verschiedene Faktoren (Tagesrhythmus, Nitrat-Gehalt des Mediums, Wachstumsphase) DMSP-Gehalt und -Produktion der Zelle beeinflussen.
- DMSP stellt eine wichtige Schwefel- und Kohlenstoffquelle für andere (heterotrophe) Organismen dar. Mit Hilfe der Verbindung $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP sollte der Aufnahme-mechanismus von DMSP anhand verschiedener Phytoplankton-Kulturen aufgeklärt werden.
- DMSP wird als wichtigste Vorstufe des klimarelevanten Gases DMS angesehen. Aufgrund der stattfindenden Klimaveränderungen sollte ermittelt werden, wie ansteigende Meerestemperaturen und höhere CO_2 -Gehalte den DMSP-Gehalt in verschiedenen Planktonkulturen beeinflussen.

3 Methodenentwicklung

3.1 Analyse von DMSP als Pyrenylmethyl-Ester (DMSP-PDAM)

3.1.1 Probenvorbereitung

WIESEMEIER und POHNERT (2007) entwickelten eine Methode zur Analyse von DMSP in Makroalgen mit Hilfe der HPLC oder UPLC mit massenselektivem Detektor. Im Rahmen der Probenvorbereitung wird DMSP mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) derivatisiert (Abb. 1.8). Diese Methode sollte für die Analyse von DMSP in Phytoplankton weiterentwickelt werden.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten Zellen aus Phytoplankton-Kulturen anzureichern. WIESEMEIER und POHNERT (2007) zentrifugierten die Kulturproben. Bei diesem Verfahren besteht aber das Problem einer vollständigen Abtrennung. Ein Teil der Zellen verbleibt im Überstand und wird nicht erfasst. Eine höhere Rotationszahl würde zu einer Erhöhung der wirkenden Scherkräfte und damit zunehmend zu einer Zerstörung der Zellen führen. WIESEMEIER und POHNERT (2007) führten im Anschluss an die Zentrifugation eine Bligh und Dyer Extraktion der konzentrierten wässrigen Zellsuspension durch. Dieses Verfahren erfordert eine Phasentrennung und damit einen zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt. Des Weiteren kann es durch den hohen Wasseranteil im Extrakt zu enzymatischen Abbaureaktionen kommen, wenn die Enzymaktivität nicht effizient durch die organischen Lösungsmittel unterdrückt wird. Aus diesen Gründen wurde für die Zellanreicherung die Filtration gewählt. Dabei erhält man ein Zellpellet mit geringem Wassergehalt, das leicht mit Methanol extrahiert werden kann. Dieser Extrakt kann ohne weitere Vorbereitung für die Derivatisierung verwendet werden.

Eine Durchführung des von WIESEMEIER und POHNERT (2007) vorgestellten Protokolls zur Derivatisierung von DMSP zeigte, dass die Verbindung nicht vollständig in den entsprechenden Ester überführt wird. UPLC/MS-Messungen wiesen sowohl das Signal des DMSP-PDAM-Derivats (m/z 349) als auch das Signal von DMSP (m/z 135) auf.

Die Vorschrift für die Derivatisierung wurde deswegen anhand von Standardlösungen optimiert. Anstelle einer einmaligen Zugabe wurde ein mehrfacher Zusatz von PDAM eingeführt. Dabei wurden die Gehalte der PDAM-Lösung, der zugesetzten Volumina, die Reaktionszeit und die Anzahl der Zusätze variiert. Die Derivatisierung wurde als vollständig angesehen, wenn das Signal von DMSP bei den UPLC/MS-Messungen nicht länger beobachtet werden konnte.

Der mehrfache Zusatz einer PDAM-Lösung erwies sich als effektiver als eine einmalige Zugabe. Bei einmaliger Zugabe verfärbte sich die anfangs rotbraune PDAM-Lösung im Laufe der

Reaktion gelb, vermutlich aufgrund von Nebenreaktion. Bei mehrmaliger Zugabe blieb die rotbraune Farbe bestehen, so dass hier von einem Überschuss des Derivatisierungsmittels ausgegangen werden konnte.

Beste Ergebnisse wurden mit einem fünfmaligen Zusatz von jeweils 80 μL einer 2,5 mg mL^{-1} PDAM-Lösung erreicht. Zwischen den einzelnen Zusätzen wurde das Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Vortexers für 5 Minuten geschüttelt (siehe 9.7.2). Diese Vorschrift ermöglichte eine vollständige Derivatisierung von 1 μmol DMSP in 50 μL Methanol (20 mmol L^{-1}). Das anhand von Standardproben optimierte Verfahren konnte trotz der komplexen Matrix direkt auf Zellextrakte von Phytoplankton-Kulturen übertragen werden.

3.1.2 Methodenvalidierung

Die Analyse des DMSP-PDAM-Esters erfolgte zunächst wie von WIESEMEIER und POHNERT (2007) beschrieben unter Verwendung einer Acquity™ UPLC BEH C18 Säule. Im Laufe der Methodenentwicklung zeigte sich jedoch, dass das von den Autoren vorgeschlagene Eluentensystem aus Wasser und Acetonitril für die Analyse ungeeignet ist. Bei den gewählten Startbedingungen (98 Vol.-% Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril und 0,1 Vol.-% Ameisensäure) kam es durch Ausfällen von unpolaren Probenbestandteilen zu Verunreinigungen im Injektorsystem, welche die weiteren Messungen beeinträchtigten. Es wurde vermutet, dass Nebenprodukte der PDAM-Synthese (siehe 9.4.3) und unpolare Derivatisierungsprodukte hierfür verantwortlich waren. Das Eluentensystem wurde deswegen auf Mischungen von Wasser, Methanol und Tetrahydrofuran (THF) umgestellt. Unter den neu gewählten Startbedingungen (Wasser/Methanol/THF (60:20:20 v/v/v) + 0,1 Vol.-% Ameisensäure) fand keine Probenverschleppung im Injektorsystem statt, die Elution des Analyten erfolgte jedoch mit der Totzeit des Systems. Aus diesem Grund wurde eine Acquity™ BEH Phenyl-Säule eingesetzt, die zu guter Wechselwirkung des DMSP-PDAM-Esters mit dem Säulenmaterial führt. Trotz des hohen organischen Anteils im Eluenten konnte hier eine Retardierung erfolgen. Das Lösungsmittel der Proben wurde an die Startbedingungen des Eluenten angeglichen, um Ausfällungen im Injektorsystem zu vermeiden.

Derivatisierte Standardproben wurden durch Verdünnung einer Stammlösung mit Wasser/Methanol/THF ((60:20:20 v/v/v) + 0,1 Vol.-% Ameisensäure) erhalten. Als interner Standard wurde D₆-DMSP verwendet. Dieses wurde separat derivatisiert und den DMSP-Proben mit einer finalen Konzentration von 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ zugefügt. Für die Kalibrationsfunktion wurde das Verhältnis der Peakflächen der Ionenspuren von DMSP (m/z 349) und D₆-DMSP (m/z 355) über

die DMSP-Konzentration aufgetragen. Aufgrund der sechsfachen Deuterierung des internen Standards können die Ionenspuren trotz der gleichen Retentionszeit ohne Überlagerung quantifiziert werden (Abb. 3.1). Die Linearität wurde im Bereich von 0,5 bis 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ bestätigt.

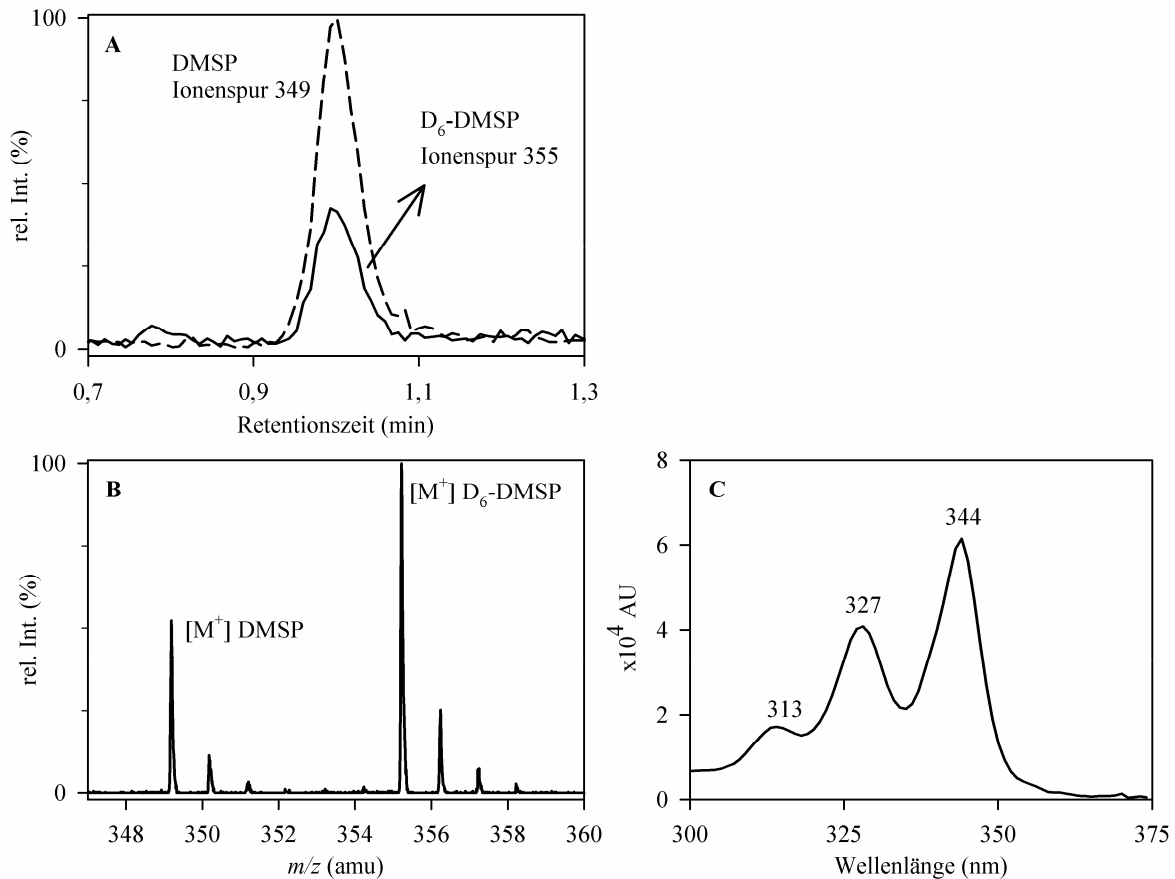


Abb. 3.1: (A) LC/MS-Chromatogramm eines derivatisierten Zellextraktes von *Skeletonema costatum* (410.000 Zellen mL^{-1} , 50 mL Filtrationsvolumen), gezeigt sind die jeweiligen Ionenspuren; (B) Massenspektrum und (C) UV-Spektrum einer derivatisierten Standardlösung (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DMSP und 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ D₆-DMSP).

Die Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden definiert als die DMSP-PDAM-Konzentration, bei der ein Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von ≥ 3 bzw. ≥ 10 erzielt wird. Beide Werte wurden für Standardlösungen ermittelt. Die NWG für DMSP-PDAM liegt bei einem Injektionsvolumen von 1 μL bei 100 nmol L^{-1} (100 fmol injiziert) und die BG bei 500 nmol L^{-1} (500 fmol injiziert). Im Vergleich zu WIESEMEIER und POHNERT (2007) konnte so eine Verbesserung der NWG um den Faktor 6 erzielt werden. Die Werte der NWG und BG beziehen sich nur auf die Derivatisierung und die anschließende Analyse. Sie schließen keine Probenvorbereitungsschritte wie Filtration ein, die zu einer Aufkonzentrierung der Zellen und damit des partikulären (intrazellulären) DMSP führen. Abhängig vom jeweiligen Filtrationsvolumen würde dies einer theoretischen Verfahrens-NWG von 2 nmol L^{-1} (100 mL

Filtrationsvolumen) oder $0,2 \text{ nmol L}^{-1}$ (1000 mL Filtrationsvolumen) entsprechen. Damit sind bei der Untersuchung von Phytoplankton-Kulturen nur kleine Filtrationsvolumina für die DMSP-Analyse notwendig (vergleiche Tab. 9.4 und Tab. 9.5). Der Anteil der detektierten Matrixbestandteile kann gering gehalten werden.

Für eine Blindwertmessung wurden 260 mL künstliches Seewasser filtriert. Der Filter wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 2 mL Methanol überführt. Die Probe wurde 9 Tage bei -20 °C gelagert. Die Messung der derivatisierten Probe zeigte weder bei 349 noch bei 355 m/z ein Signal. Die Seewassermatrix führt somit zu keiner Peaküberlagerung.

Die Messpräzision wurde durch sechsfache Injektion von Kalibrationsstandards ermittelt. Die relative Standardabweichung (RSD) betrug zwischen 0,9 und 2,3% im Bereich von 5 bis $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Ein Maximum der RSD wurde an der BG mit 5% erreicht. Für derivatisierte Zellextrakte wurde eine Messpräzision von 5% ($n = 3$) erhalten. Die biologische Variabilität liegt oftmals höher (vergleiche hierzu Tab. 4.2).

Die Präzision der Derivatisierung bei Anwesenheit der Zellmatrix wurde anhand eines Zellextraktes von *Emiliana huxleyi* (CCMP 1516) bestimmt. Dieser wurde mit DMSP und D_6 -DMSP versetzt. Sechs Aliquote von $800 \text{ } \mu\text{L}$ ($228 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ DMSP, $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ D_6 -DMSP) wurden im Stickstoffstrom auf $50 \text{ } \mu\text{L}$ reduziert, derivatisiert und wie oben beschrieben analysiert. Es wurde eine Präzision von 5,2% ermittelt.

Der Einfluss der Zellextraktmatrix auf die Derivatisierung und anschließende Quantifizierung wurde mit Hilfe einer Kultur von *Skeletonema costatum* (RCC 75, $410.000 \text{ Zellen mL}^{-1}$) bestimmt. Es wurden 20 bis 300 mL bei reduziertem Druck filtriert und gemäß dem Protokoll aufgearbeitet. Für sieben verschiedene Kulturvolumina wurden zwischen 0,29 und 0,32 pg DMSP pro Zelle bestimmt. Zwischen den Ergebnissen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (ANOVA mit Tukey Post Hoc Test, $p > 0,05$) und es konnte kein Trend nachgewiesen werden (Trendtest nach Neumann).

Deuterierte Verbindungen weisen eine höhere Flüchtigkeit als ihre nicht-deutierten Analoga auf. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Lösungsmittelverdampfung auf die Quantifizierung getestet. Hierfür wurden von sechs Standardlösungen in Methanol jeweils 1,5 mL auf $50 \text{ } \mu\text{L}$ im Stickstoffstrom reduziert und anschließend derivatisiert. Die erhaltene Wiederfindungsfunktion zeigte weder einen konstant- noch proportional-systematischen Fehler. Ein Einengen der Proben im Stickstoffstrom hat keinen Einfluss auf die Richtigkeit.

Anhand einer Kultur von *Thalassiosira weissflogii* (RCC 76) wurde für verschiedene DMSP-Konzentrationen die Wiederfindungsrate (WFR) ermittelt. Diese Kultur produziert keine

quantifizierbare Mengen an DMSP, so dass die Bestimmung der WFR nicht beeinflusst wird. Zu dem jeweiligen Zellextrakt (142 mL filtriert, $59200 \text{ Zellen mL}^{-1}$) wurden 20, 50, 100 und 200 nmol DMSP und jeweils 20 nmol D_6 -DMSP hinzugefügt; 100 μL des dotierten Extrakts wurden derivatisiert. Die Proben wurden anschließend 72 Stunden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ und 24 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Aufbewahrung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ entspricht der Lagerung der Proben im Autosampler. Die Analyse lieferte eine WFR zwischen 95 und 105%.

Für die Ermittlung der Probenstabilität wurden derivatisierte Zellextrakte und Standardproben bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Nach sechs Monaten wurden noch über 90% bzw. über 80% der ursprünglichen DMSP-Konzentration gefunden. Mit DMSP und D_6 -DMSP versetzte Zellextrakte von *Thalassiosira weissflogii* (RCC 76) zeigten nach einer Lagerzeit von sieben Monaten bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ Wiederfindungsraten zwischen 95 und 105% (vergleiche auch 3.2). Methanol-Extrakte sind damit für eine langfristige Lagerung geeignet. Dies ermöglicht eine Anwendung der Methode im Rahmen von Feldstudien, bei denen keine sofortige Analyse erfolgen kann.

Die Aufbewahrung der Filter in Methanol dient nicht nur der Zerstörung der Zellen und Extraktion des DMSP, sondern auch zur Inhibierung von Enzymen, die im Fall der DMSP-Lyase einen Abbau von DMSP bewirken würden. Um zu überprüfen, ob eine mögliche verbleibende Lyase-Aktivität Auswirkungen auf das Ergebnis hat, wurden verschiedene Probenvorbereitungen anhand von sechs Phytoplankton-Kulturen getestet (*S. costatum*, *S. marinoi*, *Prorocentrum minimum*, drei verschiedene Stämme von *E. huxleyi*). Jede Kultur wurde vor der Filtration in sechs Aliquote aufgeteilt, mit denen drei Behandlungen durchgeführt wurden (Doppelbestimmung). Um die Ergebnisse der Behandlungen *ii*) und *iii*) quantitativ mit dem Verfahren *i*) vergleichen zu können, erfolgte die Analyse der Proben mit Hilfe der indirekten SPME (Festphasenmikroextraktion)-GC/MS-Methode (für Methodendetails siehe 9.3.4 und 9.7.6).

i) Überführung des Filters in ein 20 mL Headspace-Vial, Zusatz des internen Standards, Zusatz von 4 mL Natronlauge (1 mol L^{-1}) und sofortiger Verschluss des Vials. Das Vial wurde 5 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Behandlung der Zellen mit konzentrierten Basen führt zu einer Denaturierung der Proteine, so dass ein enzymatischer Abbau von DMSP unwahrscheinlich ist. Eine zu Beginn der Inkubation noch vorhandene Lyase-Aktivität würde das Ergebnis jedoch nicht verfälschen, da das enzymatisch freigesetzte DMS ebenfalls detektiert werden würde.

ii) Überführung des Filters in Methanol mit internem Standard, Behandlung des Filters mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD 2070, 30% Energie, zwei kontinuierliche Pulse für 15 Sekunden), Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Durch den Ultraschall werden die Zellen zerstört, so dass

das extrazelluläre D₆-DMSP und das intrazelluläre DMSP sofort vermischt werden. Beide Substanzen würden gleichermaßen enzymatisch abgebaut werden.

iii) Überführung des Filters in Methanol mit internem Standard, Lagerung bei -20 °C. Die Zellen werden langsam durch Methanol zerstört. Bei verbleibender Lyase-Aktivität würde das Ergebnis verfälscht werden. Im Fall einer intrazellulären DMSP-Lyase würde zunächst nur das intrazelluläre DMSP abgebaut werden. In diesem Fall müsste die Behandlung *iii*) im Vergleich zu den anderen zwei Varianten einen niedrigeren DMS-Gehalt liefern (Verhältnis DMS:D₆-DMS kleiner als in den anderen Proben). Im Falle einer extrazellulären DMSP-Lyase würde zunächst nur das extrazelluläre D₆-DMSP abgebaut werden. In diesem Fall würde im Vergleich zu den anderen zwei Varianten ein höherer DMS-Gehalt ermittelt werden (Verhältnis DMS:D₆-DMS größer als in den anderen Proben).

Die Proben von *i*) und *ii*) wurden nach 5 Stunden, die Proben von *iii*) nach 6 Tagen untersucht. Aufgrund der Zeitspanne zwischen den Messungen der jeweiligen Behandlungen wurden die Proben von *ii*) zusätzlich nach sechs Tagen analysiert. So konnte überprüft werden, dass vergleichbare Analysenbedingungen für die jeweiligen Proben vorlagen. Zwischen den drei Behandlungen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (ANOVA, $p > 0,05$). Das Verfahren nach *iii*) unterdrückt somit die Enzymaktivität bzw. werden stattfindende Abbauprozesse durch den internen Standard ausgeglichen.

Im Vergleich zu indirekten Bestimmungsmethoden via DMS-Freisetzung liegt die NWG der hier eingeführten Methode deutlich höher (100 nmol L⁻¹ im Vergleich zu zum Beispiel 0,3 nmol L⁻¹ bei 10 mL Filtrationsvolumen, SMITH *et al.* 1999). Nichtsdestotrotz kann eine Quantifizierung des partikulären DMSP bereits ab einem Filtrationsvolumen von 20 mL vorgenommen werden. Für *S. costatum* wurde für Filtrationsvolumina von 20 bis 300 mL kein Sensitivitätsverlust mit steigendem Filtrationsvolumen beobachtet. Für fragilere Kulturen müssten Untersuchungen zum Einfluss des Filtrationsvolumens auf den bestimmten DMSP-Gehalt der Zelle bei Bedarf zusätzlich vorgenommen werden.

Die LC/MS-Methode für die Analyse des DMSP-PDAM-Esters wurde für Planktonproben aus der Ostsee getestet (siehe 9.6.1). Zum Zeitpunkt der Probennahme lag keine Blütesituation vor. Filtrationsvolumina von 30 oder 100 mL lieferten kein DMSP-Signal, Volumina von 1000 mL (oder mehr) waren für die Bestimmung von DMSP geeignet. Die Filtration großer Volumina bei vermindertem Druck birgt aber das Risiko, dass Zellen aufgrund der wirkenden Scherkräfte zerstört werden und DMSP aus der Zelle austritt (KIENE und SLEZAK 2006). Der interne Standard würde an dieser Stelle den Verlust nicht kompensieren können, da er erst nach der

Filtration zugesetzt wird. Die indirekten Bestimmungsmethoden sind deswegen zu empfehlen, wenn niedrige Nachweisgrenzen und keine quantitativen Informationen über andere DMS-freisetzende Verbindungen benötigt werden (zum Beispiel Übersichtsanalysen in Freilandstudien).

Bei Bedarf niedriger NWG bietet die Derivatisierungsmethode noch Spielraum für eine weitere Verbesserung. So kann das Injektionsvolumen auf bis zu 20 μL erhöht werden. Die Aufnahme der derivatisierten Probe kann in weniger als 100 μL erfolgen; das verwendete Volumen von 100 bis 350 μL wurde auch aufgrund der leichteren Handhabung gewählt. Auf diese Weise kann schnell eine Verbesserung der NWG um Faktor 10 erzielt werden. Schon jetzt kann die Methode für die Untersuchung von Planktonproben angewendet werden (siehe Kapitel 4 und 5) und ist auch mit den genannten Einschränkungen für die Analyse von natürlichen Planktonproben geeignet.

Tab. 3.1: Vergleich einiger Methodenparameter der Bestimmung von DMSP nach Derivatisierung mittels LC/MS mit der etablierten indirekten Methoden (GC)

Parameter	LC	GC
NWG	100 fmol pro μL Injektion (2 nmol L^{-1} bei 100 mL Filtrationsvolumen)	0,3 nmol L^{-1} (10 mL Filtrationsvolumen, SMITH <i>et al.</i> 1999)
indirekte Bestimmung via DMS?	nein	ja
mehrfache Injektion möglich?	ja	nein
Analyse anderer DMS-Vorstufen möglich?	ja	nein
Lagerung möglich?	ja	eingeschränkt
benötigte Ausstattung	LC/MS	HS oder SPME-GC mit FID ¹ , FPD ² oder MSD ³

¹Flammenionisationsdetektor, ²Flammenphotometrischer Detektor, ³massenselektiver Detektor

3.2 Analyse von DMSP mittels HILIC

Die in 3.1 beschriebene Methode liefert gute Ergebnisse für die Analyse von DMSP in Planktonproben, ist aber durch die Derivatisierung mit PDAM mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden. Eine direkte Analyse von DMSP könnte die Zeit für die Probenvorbereitung deutlich verkürzen. Als aussichtsreiche Alternative wurde dabei die Technik der Hydrophilen Interaktionsflüssigchromatographie (HILIC) angesehen. Die Quantifizierung von DMSP könnte anhand dieser Technik ohne Derivatisierung erfolgen.

Der Begriff HILIC wurde erstmals 1990 erwähnt (ALPERT 1990) und stellt eine Kombination von Einheiten der Normalphasen-, Umkehrphasen- und Ionenchromatographie dar. HILIC eignet sich für die Analytik von polaren Verbindungen. Dabei wird eine Normal- oder Ionenphase (z.B. R_3SiOH , (Zwitter-)Ionen) mit einem Eluentensystem aus der Umkehrphasen-LC betrieben (z.B. Wasser und Acetonitril).

Bei Anwendung der HILIC hat der Eluent zu Beginn der Analyse nur einen geringen Wassergehalt (mindestens 5%). Dadurch bildet sich auf der polaren Säulenoberfläche eine wässrige Quellschicht aus, die in Kontakt mit dem Eluenten steht. Das Trennprinzip der HILIC kann somit als Flüssig-Flüssig-Extraktion beschrieben werden. Der polare Analyt geht zu Beginn der Messung in diese Quellschicht über und wird retardiert. Zusätzlich tritt der Analyt mit der Säulenoberfläche in Wechselwirkung. Durch Erhöhung des wässrigen Anteils im Eluenten kommt es zu einer Elution (APPELBLAD *et al.* 2008).

Für die Methodenentwicklung wurde eine AcquityTM UPLC BEH HILIC-Säule verwendet. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um unmodifiziertes Kieselgel. Dieses ist unter HILIC-Bedingungen für die Analyse polarer ungeladener Verbindungen wie zum Beispiel Zucker sehr gut geeignet. Im Fall von geladenen Verbindungen liegen keine optimalen Wechselwirkungen zwischen der Säulenoberfläche und dem Analyten vor. Die Retardierung der Substanz geht hier in erster Linie auf den hohen organischen Anteil im Eluenten zu Beginn der Analyse zurück. Die Entwicklung eines geeigneten Eluentensystems und Gradienten erwies sich vor diesem Hintergrund als diffizil. Der Zusatz von Ameisensäure zu den Eluenten Wasser und Acetonitril verschlechterte sowohl die Peakform als auch die Peakintensität des DMSP-Signals. Aus diesem Grund wurden Eluenten ohne weitere Zusätze verwendet. Hohe Flussraten ($0,30 \text{ mL min}^{-1}$ oder mehr) führten zu breiten Signalen. Eine Erhöhung der Elutionskraft über einen längeren Zeitraum verschlechterte die Peakform deutlich. Aufgrund der geringen Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Säulenoberfläche führte schon eine geringfügige Erhöhung des Wasseranteils im Eluenten zu einer teilweisen Elution der Substanz. Nur durch schnelle und deutliche Erhöhung der Elutionskraft konnte eine Peakverbreiterung vermieden werden. Als Konsequenz musste der Wasseranteil im Eluenten innerhalb von 0,01 Minuten von 10% auf 60% angehoben werden (siehe Tab. 9.2).

Für die Methodenentwicklung wurden DMSP-Standardlösungen zunächst in Acetonitril/Wasser hergestellt. Dabei wurde für DMSP eine Retentionszeit von 1,56 Minuten beobachtet. Die Nachweisgrenze der Methode war unter diesen Bedingungen jedoch sehr hoch (Abb. 3.2 A).

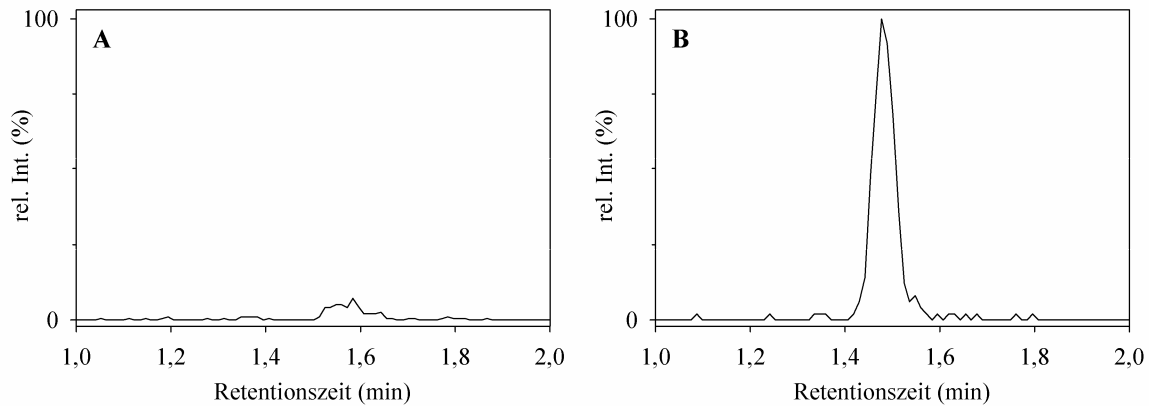


Abb. 3.2: Ionenspur der HILIC-LC/MS-Analyse einer 100 nmol L^{-1} DMSP-Lösung (A) ohne Seewasser-Zusatz und (B) mit $40 \text{ }\mu\text{L}$ Seewasser (Injektionsvolumen $3 \text{ }\mu\text{L}$, gezeigt ist die Ionenspur $m/z = 135$).

Bei der Injektion von verdünnten Algenextrakten (9.7.3) wurde für DMSP eine Retentionszeit von 1,47 Minuten beobachtet (Abb. 3.3 D). Die Signale waren dabei intensiver und die Peakform schmaler. Als Ursache hierfür wurden Matrixbestandteile der Extraktproben angesehen. Da eine reproduzierbare Simulation der Matrix für unterschiedliche Versuchsreihen nicht möglich ist, wurde als Alternative der Zusatz von Seewasser zu den Standardlösungen getestet. Zusätze von 10, 20 und $40 \text{ }\mu\text{L}$ zu 1 mL Standardlösung zeigten eine zunehmende Verschiebung der Retentionszeit von 1,56 auf 1,47 Minuten (Abb. 3.2 B). Die Peakform verbesserte sich (geringere Peakbreite), darüber hinaus wurde das Signal des Analyten intensiver. Standardlösungen wurden aus diesem Grund vor der Messung mit Seewasser versetzt ($40 \text{ }\mu\text{L}$ zu 1 mL), um eine Vergleichbarkeit der Chromatogramme von Standard- und Realproben zu gewährleisten (Abb. 3.3 C und D). Um den Anteil von polaren Probenbestandteilen in den Standardlösungen gering zu halten, wurde von höheren Seewasser-Zusätzen abgesehen.

Auf dem Säulenmaterial verbleibende polare Verunreinigungen beeinträchtigen deutlich die Peakform von DMSP. Bei Entwicklung eines geeigneten Gradienten wurde der Fluss anfangs konstant bei $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ gehalten. Dabei zeigte sich, dass bei mehrfacher Injektion einer Standardlösung der DMSP-Peak verbreitert wird und ein zweites Maximum bei 1,56 Minuten auftritt. Die Ursache liegt vermutlich in der Kieselgeloberfläche des Säulenmaterials. Diese zeigt eine hohe Affinität zu polaren Substanzen, die die Trennleistung der Säule für die zwitterionische Verbindung DMSP reduzieren. Eine vollständige Entfernung dieser Störkomponenten war notwendig, um gerade im Hinblick auf große Messserien konstante Bedingungen zu garantieren. Der Wasseranteil im Eluenten wurde im Verlauf der Messung auf 60% erhöht. Eine weitere Steigerung und damit eine stärkere Elutionskraft konnte aufgrund des Säulenmaterials nicht vorgenommen werden. Um die Reinigung der Säule zu beschleunigen,

wurde für den Spülschritt im Gradienten die Flussrate erhöht ($0,60 \text{ mL min}^{-1}$). Polare Bestandteile der Probenmatrix konnten so innerhalb einer Minute effektiv entfernt werden. Die Erhöhung der Flussrate fand nach der Elutionszeit des DMSP statt, so dass die Analyse nicht beeinflusst wurde.

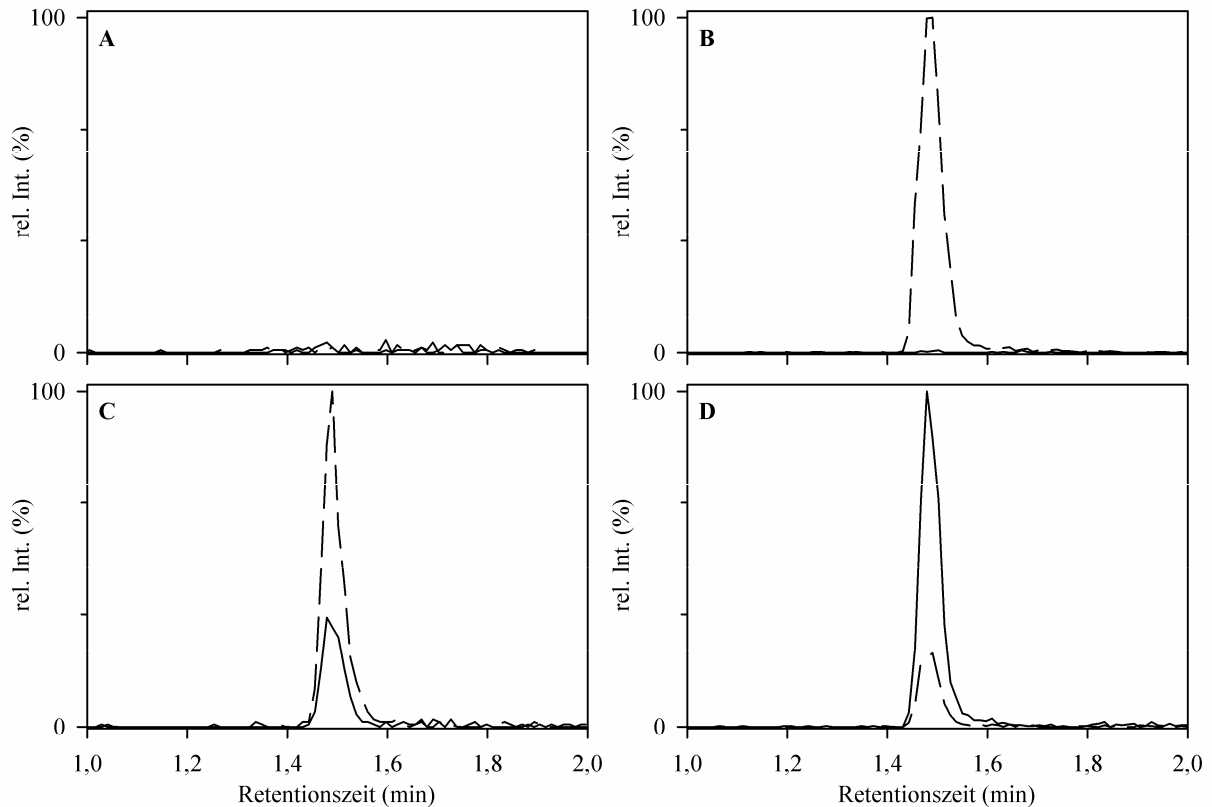


Abb. 3.3: Ionenspuren der HILIC-LC/MS-Analyse von (A) Blindwert (Wasser/Acetonitril und Seewasser, Intensität normalisiert zur Intensität von D_6 -DMSP in (B)), (B) D_6 -DMSP-Lösung ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{L}$ Injektion), (C) DMSP-Standardlösung (60 nmol L^{-1} DMSP, 200 nmol L^{-1} D_6 -DMSP, $5 \mu\text{L}$ Injektion) und (D) Methanol-Extrakt von *Skeletonema costatum* (1:10 verdünnt, $1 \mu\text{L}$ Injektion); durchgezogene Linie zeigt Ionenspur von DMSP ($135 m/z$), gestrichelte Linie von D_6 -DMSP ($141 m/z$).

Die schnelle Erhöhung des Wasseranteils im Eluenten hat zur Folge, dass viele Substanzen koeluiieren. Um das Risiko der Detektion anderer Seewasser- oder Extrakt-Bestandteile zu minimieren, wurde für die Auswertung die jeweilige Ionenspur mit einem kleinen Massenfenster von $0,05 \text{ Da}$ verwendet. Eine Blindwertmessung (1 mL Acetonitril/Wasser $9:1 v/v$ + $40 \mu\text{L}$ Seewasser) ergab keine Signale bei den jeweiligen Ionenspuren von DMSP und D_6 -DMSP bei einem gewählten Bereich von $0,05 \text{ Da}$ (Abb. 3.3 A). Die Messung eines D_6 -DMSP Standards ergab kein Signal bei $135 m/z$ (Abb. 3.3 B). Die Seewasser-Matrix hat somit unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Quantifizierung.

Die Linearität wurde im Bereich von 0,06 bis 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ bestätigt. Der interne Standard D_6 -DMSP wurde dabei in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet (200 nmol L^{-1} und 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Die NWG der Methode liegt bei einem Injektionsvolumen von 5 μL bei 20 nmol L^{-1} (S/N 3:1, 100 fmol injiziert), die BG bei 60 nmol L^{-1} (S/N 10:1, 300 fmol injiziert). Eine Erhöhung des Injektionsvolumens führte zu keiner Verbesserung der NWG. Zur zusätzlichen Absicherung der BG wurde eine 60 nmol L^{-1} DMSP-Standardlösung mehrfach (6x) injiziert. Die Auswertung ergab eine RSD von < 10% und eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120%.

Die NWG und BG wurden für Standardlösungen ermittelt und liegen im Vergleich zu der in 3.1 vorgestellten Methode um Faktor fünf bzw. Faktor acht niedriger. Dabei muss aber beachtet werden, dass bei der Analyse von Algenextrakten vor der Messung eine Verdünnung der Proben mit Acetonitril erfolgen muss (9.7.3). Dadurch erhöht sich die NWG des gesamten Verfahrens und liegt bei einem Verdünnungsfaktor 10 bei 200 nmol L^{-1} . Proben, die mit Hilfe der HILIC analysiert werden, müssen mindestens 50% Acetonitril enthalten, um den HILIC-Effekt ausnutzen zu können (Verteilung des Analyten zwischen wässriger Quellschicht und organischem Eluenten). Eine Injektion von Methanol-Lösungen ist keine Alternative, da Methanol unter HILIC-Bedingungen eine vergleichbare Elutionskraft wie Wasser hat (APPELBLAD *et al.* 2008). Bei Zellextrakten von Phytoplankton-Kulturen kann eine Verdünnung mit Acetonitril/Wasser (9:1 v/v) problemlos um Faktor 10 erfolgen, ohne in den Bereich der BG zu gelangen. Durch die vorangegangene Filtration erfolgt bereits eine ausreichende Aufkonzentrierung des Analyten. Für die Analyse des im Meerwasser gelösten DMSP stellt dies aber ein Hindernis dar (detaillierte Ausführungen hierzu in 3.4).

Die Messpräzision der Methode wurde durch Quantifizierung von DMSP-Standardlösungen der Konzentration 100 nmol L^{-1} , 1 und 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ an einem Tag (intra-day precision) und an mehreren Tagen (inter-day precision) ermittelt. Für Kulturproben wurden Extrakte der Kulturen von *Skeletonema costatum* und *Emiliana huxleyi* an mehreren Tagen analysiert. In allen Fällen wurde eine Messpräzision von < 8% bestimmt.

Zur Überprüfung der Probenstabilität wurden DMSP-Standardlösungen der Konzentrationen 100 nmol L^{-1} , 1 und 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in Acetonitril/Wasser angesetzt (9:1 v/v + 40 μL Seewasser zu 1 mL Standardlösung) und nach 0, 14, 24, 92 und 164 Stunden gemessen. Die Standardlösungen zeigten eine geringe Stabilität, was sich in abnehmenden Peakintensitäten widerspiegelte. Die Probe mit 100 nmol L^{-1} konnte bereits nach 24 Stunden nicht mehr quantitativ ausgewertet werden. Nichtsdestotrotz konnten für die anderen Standards (1 und 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nach 7 Tagen über 90% der anfänglichen DMSP-Konzentration ermittelt werden. Diese hohe Wiederfindungs-

rate geht auf die Verwendung von D₆-DMSP als internen Standard zurück. Da die C-D-Bindung nicht in die Spaltung von D₆-DMSP zu D₆-DMS und Acrylsäure involviert ist, ist kein kinetischer Isotopeneffekt beim Abbau des Analyten zu erwarten. Dies wurde dadurch bestätigt, dass sowohl die deuterierte als auch die nicht-deuterierte Verbindung eine Abnahme der Peakintensität zeigten. Da das Peakflächenverhältnis der beiden Substanzen für die Auswertung genutzt wird, wird die DMSP-Quantifizierung nicht von Abbauprozessen beeinträchtigt.

Es konnte nicht aufgeklärt werden, was die Ursache für den Substanzverlust in der Probe ist. Standardproben (1 μmol L⁻¹) zeigten nach 3 Monaten Lagerung bei -20 °C eine deutlich reduzierte Peakfläche, die aber noch auswertbar war. Es findet somit kein quantitativer Abbau von DMSP in Acetonitril/Wasser statt.

Im Unterschied zu den Standardlösungen zeigten mit DMSP und D₆-DMSP versetzte Zellextrakte von *Thalassiosira weissflogii* (RCC 76) nach einer Lagerzeit von sieben Monaten bei -20 °C Wiederfindungsraten zwischen 95 und 105%. Methanol-Extrakte können unter Verwendung des internen Standards für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden. Dies ist ideal für Feldversuche oder Langzeitstudien. Die Verdünnung der Proben mit Acetonitril/Wasser sollte aber direkt vor der jeweiligen Messserie erfolgen.

3.3 Analyse von DMSP mittels ZIC-HILIC

Als Alternative zu der Acquity UPLCTM BEH HILIC-Säule von Waters wurde eine HILIC Säule mit zwitterionischem Säulenmaterial getestet (ZIC®-HILIC, Merck). Bei diesem Säulenmaterial wurde das Kieselgel mit zwitterionischen Gruppen modifiziert. Im Unterschied zu der in 3.2 verwendeten HILIC-Säule kann hier eine ideale Wechselwirkung zwischen dem Analyten und dem Säulenmaterial stattfinden.

Bei der Entwicklung eines geeigneten Gradienten wurden verschiedene Eluent-Zusammensetzungen getestet. Es wurde zunächst das Eluentensystem der HILIC-Methode angewendet (Wasser und Acetonitril ohne weitere Zusätze). Dabei ergaben sich aber sowohl schlechte Peakformen als auch geringe Peakintensitäten. Der Zusatz von Ameisensäure verbesserte die Peakform, führte aber zu einer deutlich reduzierten Retardierung der Substanzen. Der Einsatz von Pufferlösungen führte zu einer Erhöhung der Peakintensitäten und für früh eluierende Substanzen auch zu einer Verbesserung der Peakform. Substanzen, die stärker mit der Säule in Wechselwirkung traten, wiesen eine sehr breite und unsymmetrische Peakform auf. Aus diesem Grund wurde ein Eluentensystem entwickelt, das sowohl die Verwendung von Pufferlösungen (Ammoniumacetat) als auch den Zusatz von Ameisensäure vorsieht (vgl. 9.3.3).

Unter den gewählten Bedingungen konnte bei einer Injektion von 20 μL eine NWG von 10 nmol L^{-1} (S/N 3:1, 200 fmol injiziert) und eine BG von 20 nmol L^{-1} (S/N 10:1, 400 fmol injiziert) erreicht werden. Die Verwendung des ZIC-HILIC Säulenmaterials besitzt mehrere Vorteile. Zum einen muss für Standardlösungen keine Simulation der Matrix (Zusatz von Seewasser) durchgeführt werden. Die Retentionszeit und Peakform werden nicht von anderen Komponenten der Probelösung beeinflusst. Für Zellextrakte ist eine Verdünnung mit Acetonitril/Wasser bereits um Faktor 2 ausreichend, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Es können höhere Injektionsvolumina (bis zu 20 μL) verwendet werden. Diese Faktoren führen zu einer deutlich verbesserten NWG für das gesamte Verfahren. Darüber hinaus ist eine Trennung verschiedener Zwitterionen möglich. Die Koelution mehrerer Verbindungen, wie sie bei der HILIC-Methode beobachtet wurde, tritt nicht mehr auf. So muss, anders als bei der HILIC-Methode, das Massenfenster für die Quantifizierung nicht verkleinert werden, da Matrixbestandteile die Ionenspur des Analyten nicht stören (Abb. 3.4).

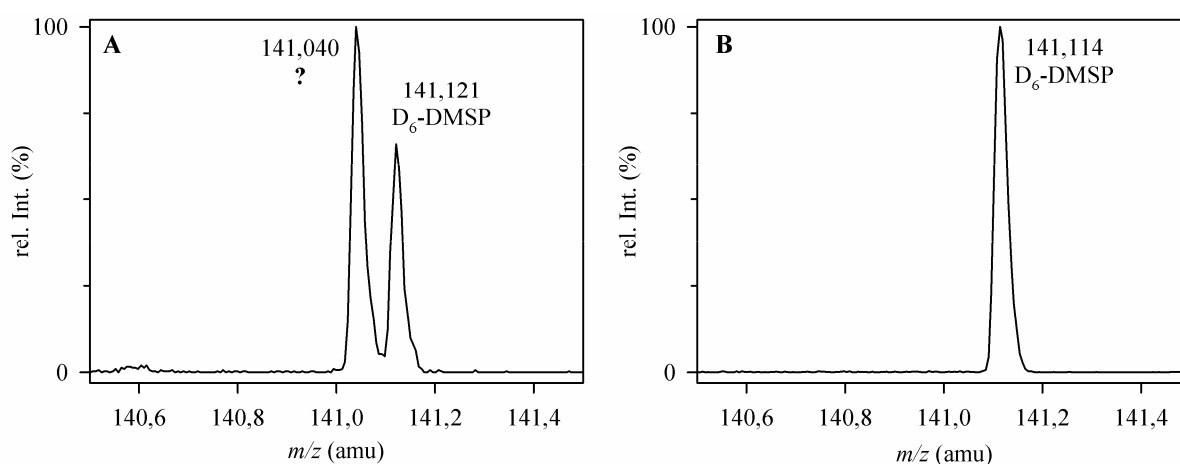


Abb. 3.4: Massenspektrum im Bereich des internen Standards D₆-DMSP für (A) die HILIC-Methode und (B) die ZIC-HILIC-Methode; es wurden die Datenpunkte des D₆-DMSP-Peaks kombiniert.

Die Linearität wurde im Bereich von 0,1 bis 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ getestet und bestätigt. Die Messpräzision lag zwischen 1,2 und 5,5%. Für Zellextraktproben wurde eine Messpräzision von < 7% ermittelt. Da die Proben wie bei der HILIC-Methode mit Acetonitril/Wasser verdünnt werden, wurden keine weiteren Stabilitätstests durchgeführt. Die Proben wurden analog vor der jeweiligen Messung verdünnt.

Für DMSP lag ein linearer Zusammenhang zwischen Peakflächenverhältnis (DMSP zu D₆-DMSP) und DMSP-Konzentration vor (Abb. 3.3 A). Für die Analyten Glycinbetain (GBT) und Gonyol konnte über den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ kein linearer Zusammenhang festgestellt werden (Abb. 3.5 B und C). Als Ursache hierfür werden die

gewählten Eluenten angesehen (siehe 9.3.3). Neben einem Gradienten der Elutionskraft findet parallel eine Veränderung der Pufferkonzentration und Konzentration der Ameisensäure im Eluenten statt. Die drei Verbindungen eluieren in der Reihenfolge GTB, DMSP und Gonyol (siehe Abb. 4.2). Beim Eintritt von GBT in die Verbindungseinheit von UPLC und Massenspektrometer liegt im Vergleich zu DMSP eine geringere, bei Gonyol eine höhere Ameisensäurekonzentration vor (vergleiche Tab. 9.3). Dies wirkt sich auf die Ionisation des Analyten aus bzw. im Fall der zwitterionischen Verbindungen auf die Protonierung der Carboxylatgruppe. Da DMSP und D₆-DMSP zeitgleich eluieren, werden beide Verbindungen gleichermaßen von der Änderung der Puffer- und Ameisensäurekonzentration beeinflusst. Das Peakflächenverhältnis steigt linear mit der DMSP-Konzentration an. Für GBT und Gonyol, die vor bzw. nach DMSP eluieren, hat der Gradient der Eluentenadditive Einfluss auf das Peakflächenverhältnis von Analyt und internem Standard. Im Fall von GBT nimmt mit steigender Analytkonzentration die Ionisierung relativ zum D₆-DMSP ab. Als Konsequenz flacht die Kalibrationsfunktion von GBT im oberen Konzentrationsbereich ab. Bei Gonyol kann der umgekehrte Fall beobachtet werden.

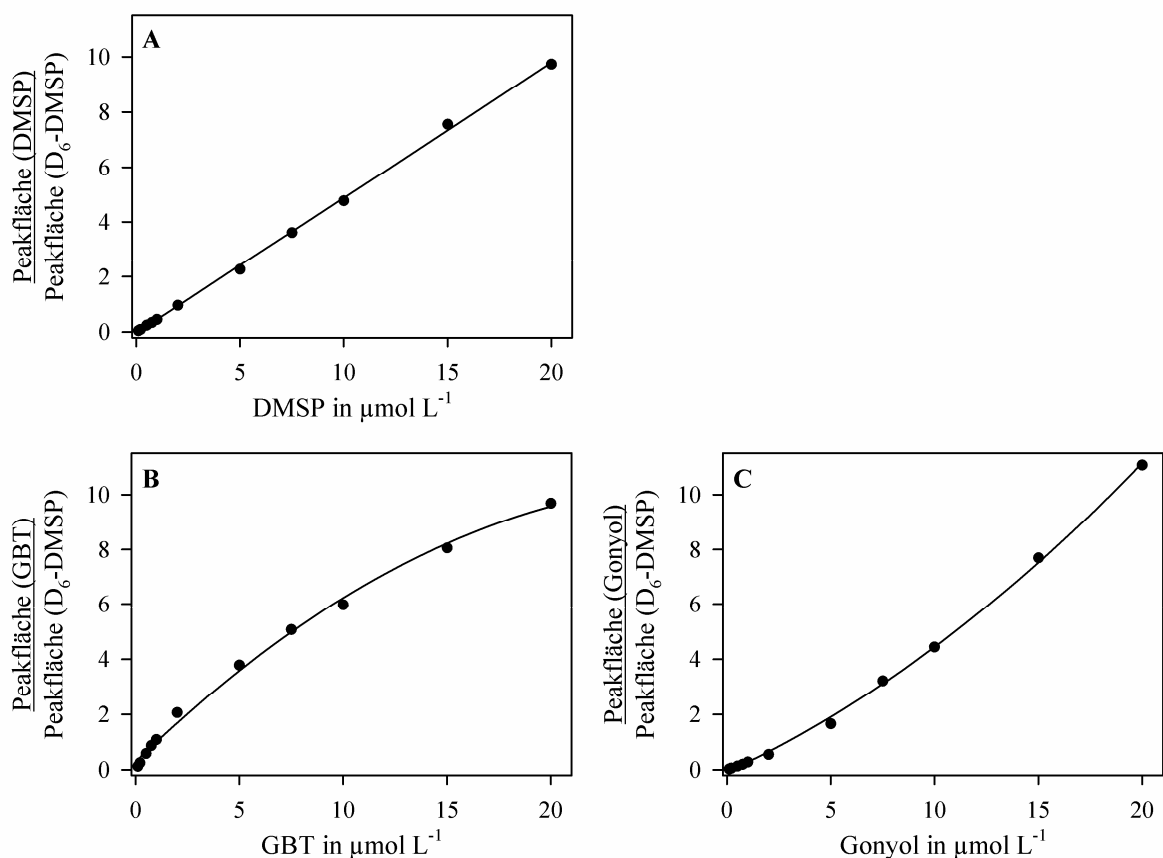


Abb. 3.5: Kalibrationsfunktion der ZIC-HILIC-Messung von (A) DMSP mit linearer Anpassung, (B) GBT und (C) Gonyol mit jeweils quadratischer Anpassung; Linie zeigt die Ausgleichskurve.

Wird eine lineare Kalibrationsfunktion angestrebt, muss der Arbeitsbereich für GBT und Gonyol entsprechend verkleinert werden (0,1 bis 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ansonsten muss die quadratische Anpassung für die Quantifizierung verwendet werden. Als Alternative könnte auf den Einsatz des internen Standards verzichtet und eine externe Kalibrierung vorgenommen werden. Dies ist aber bei labilen Verbindungen wie DMSP und GBT nicht zu empfehlen. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz mehrerer interner Standards (z.B. deuterierte Verbindungen von GBT und Gonyol). Weiterhin könnte die externe Zufuhr von Ameisensäure vor der Schnittstelle von UPLC und Massenspektrometer zu vergleichbaren Bedingungen bei der Ionisation führen.

3.4 Analyse von DMSP in Meerwasser-Proben

Neben dem intrazellulären DMSP sollte auch eine Analyse des extrazellulären, im Medium gelösten DMSP (DMSPd) erfolgen. Die Konzentrationen von DMSPd liegen im Meerwasser bei wenigen nmol pro Liter (für eine Übersicht siehe KIENE und SLEZAK 2006). In Mesokosmos- oder Laborstudien kann die Konzentration aufgrund höherer Zelldichten zeitweise über 100 nmol L^{-1} betragen (KWINT und KRAMER 1996, VOGT *et al.* 2008, BUCCIARELLI *et al.* 2007). Aufgrund der Nachweisgrenzen der oben vorgestellten Analysemethoden ist für den unteren Konzentrationsbereich (bis 40 nmol L^{-1}) eine vorherige Anreicherung des DMSP notwendig.

Es wurden zunächst unterschiedliche Kationenaustauscher-Materialien getestet. Durch Anpassung des pH-Wertes sollte die Carboxylatgruppe protoniert werden. Dadurch würde DMSP als Kation vorliegen. Mit sinkendem pH-Wert wird aber bei schwachen Kationenaustauschern (WCX) auch die funktionelle Gruppe des Ionenaustauschers deaktiviert. Als Kompromiss wurde für WCX-Materialien die Probenlösung in deionisiertem Wasser mit Salzsäure (1 mol L^{-1}) auf pH-Wert 5 gebracht, für andere Materialien wurde ein pH-Wert von 3 eingestellt. Mit starken Kationenaustauschern (SCX wie zum Beispiel SA® von Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurde unter diesen Bedingungen eine Rückhaltung des DMSP beobachtet (gemessen ohne Derivatisierung mittels RP-LC/MS, Ionenspur 135 *m/z*). Bei Anreicherung von DMSP aus künstlichem Seewasser (MAIER und CALENBERG 1994) erfolgte jedoch aufgrund des Salzgehaltes keine Rückhaltung. Es findet wahrscheinlich eine Konkurrenzreaktion um die funktionellen Gruppen des Säulenmaterials statt. Ionenaustauscher waren damit nicht für die Anreicherung des Analyten geeignet.

Als weitere Möglichkeit wurde das Einengen der Probe mittels Gefriertrocknung getestet. Auch hier kam es zu größeren Verlusten des DMSP (ca. 50%). Als Ursache wird die Spaltung von DMSP zu DMS und Acrylsäure angesehen. Durch Anlegen eines Vakuums wird gebildetes DMS

permanent entfernt, so dass eine fortwährende Spaltung von DMSP begünstigt wird. Dies führt über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu einer Abnahme der DMSP-Konzentration in der Probe. Dieser Effekt wurde durch die Seewassermatrix verstärkt.

Da eine Anreicherung des zwitterionischen DMSP mittels Festphasenextraktion (SPE) zunächst nicht möglich war, wurde versucht die Verbindung durch Derivatisierung mit PDAM in ein Kation zu überführen. Anschließend sollte mit dem DMSP-PDAM-Ester eine Aufkonzentrierung durchgeführt werden.

Als eine Variante wurde die Derivatisierung des Analyten auf einer SPE-Säule angesehen (*in situ* Derivatisierung). Das Eluat würde bereits den DMSP-PDAM-Ester enthalten und könnte sowohl gelagert als auch direkt analysiert werden. Da PDAM eine sehr reaktive Verbindung darstellt, kann sie nicht in Verbindung mit Säulenmaterialien auf Kieselgel-Basis angewendet werden. Das Material HR-X® (Macherey-Nagel) ist auf Polymerbasis aufgebaut und zeigte keine Reaktion mit einer PDAM-Lösung (bleibende rotbraune Färbung). Bei der Aufgabe einer DMSP-Lösung auf eine mit PDAM-beladene HR-X®-Kartusche (4 mg PDAM in 2 mL Diethylether auf 200 mg Säulenmaterial) konnte im Eluat der DMSP-PDAM-Ester nachgewiesen werden. Allerdings zeigte auch dieses Verfahren bei DMSP-Konzentrationen unterhalb von 100 nmol L^{-1} kein Signal des DMSP-PDAM-Esters. Als Grund wurde die kurze Kontaktzeit zwischen Probelösung und Säulenmaterial angesehen. Um eine längere Kontaktzeit zu ermöglichen, wurde das beladene Säulenmaterial in eine DMSP-Lösung überführt und für 5 Stunden geschüttelt. Dieser Ansatz blieb jedoch erfolglos.

Es existieren Methoden zur Analyse kurzkettiger Fettsäuren, die ein Aufbringen des PDAM auf eine SPME-Faser und eine anschließende Derivatisierung auf der Faser vorsehen (PAN *et al.* 1995). Derartige Verfahren besitzen den Nachteil, dass die Proben zeitnah analysiert werden müssen. Eine Lagerung der beladenen Fasern ist nicht möglich. Im Hinblick auf Feldstudien mit hohem Probandurchsatz wurde diese Methode als ungeeignet betrachtet. Der Ansatz wurde nicht weiter verfolgt.

Im weiteren Verlauf wurde die direkte Derivatisierung des DMSP in Seewasser getestet. PDAM wurde in 1 mL Ethylacetat gelöst (1 oder $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) und zu 5 mL einer DMSP-Seewasserlösung gegeben (Endkonzentration je 100 nmol L^{-1} DMSP und D_6 -DMSP). Die Probe wurde 2 Minuten geschüttelt und die organische Phase abgenommen. Das Verfahren wurde zweimal wiederholt. Die organische Phase wurde anschließend im Stickstoffstrom eingengt und in $500 \mu\text{L}$ Wasser/Methanol/THF (60:20:20 *v/v/v* + 0,1 Vol.-% Ameisensäure) aufgenommen. In einem anderen Versuch wurden 5 mL einer DMSP-Seewasserlösung (Endkonzentration

10 nmol L⁻¹ DMSP und 20 nmol L⁻¹ D₆-DMSP) mit 1 mg PDAM in 1 mL Dichlormethan extrahiert (10 Minuten). Die wässrige Phase wurde entfernt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, so dass insgesamt 15 mL Seewasser mit der PDAM-Lösung extrahiert wurden. Die organische Phase wurde anschließend im Stickstoffstrom eingengt und in 200 µL Wasser/Methanol/THF (60:20:20 v/v/v + 0,1 Vol.-% Ameisensäure) aufgenommen. Für letztgenanntes Verfahren wäre bei einem Extraktionserfolg von mindestens 66% ein DMSP-Signal im Bereich der Bestimmungsgrenze zu erwarten. In beiden Fällen lieferte die Analyse jedoch kein Signal von DMSP oder dem internen Standard. Ein Grund könnte das notwendige Einengen des Extrakts darstellen. Werden größere Probenvolumina im Stickstoffstrom reduziert, geht ein Teil des DMSP in Form des leichtflüchtigen DMS verloren. Gerade bei kleineren Konzentrationen kann dies entscheidend für das Nachweisvermögen sein. Darüber hinaus kann es zu einer Verteilung des derivatisierten DMSP zwischen der wässrigen und organischen Phase kommen. Trotz des großen hydrophoben Restes könnte die positive Ladung des Esters dazu führen, dass ein Teil des Analyten in der wässrigen Phase verbleibt und damit nicht erfasst wird. Da sich eine Anreicherung des Analyten als schwierig erwies, wurde eine Verbesserung der NWG durch Einsatz eines Fluoreszenzdetektors getestet (Modell LC-10AT, Shimadzu, Deutschland; Ausgabe über Schreiber). Im Laufe mehrerer Versuche zeigte sich, dass die Fluoreszenzdetektion zu unspezifisch ist. Nebenprodukte, die im Laufe der Derivatisierungsreaktion gebildet werden, liefern aufgrund des Pyrenringes ebenfalls ein Signal bei der gewählten Anregungs- und Emissionswellenlänge (343 bzw. 395 nm, vergleiche SCHNEEDE und UELAND 1992, RITOV *et al.* 2002). Diese Signale traten auch bei niedrigen Retentionszeiten (0,5 bis 1,5 Minuten) auf, in dem DMSP-PDAM eluiert. Eine eindeutige Zuordnung des DMSP-PDAM-Peaks war somit nicht möglich. Dieses Problem blieb auch bei einer Abwandlung des Derivatisierungsprotokolls bestehen (niedrigere PDAM-Konzentrationen, PDAM mit höherer Reinheit). Unter diesen Umständen war weder eine qualitative noch eine quantitative Aussage über DMSP möglich. Die Fluoreszenzdetektion wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

Da die ZIC-HILIC-Säule eine gute Retardierung des Analyten zeigte, wurde der Einsatz von ZIC-HILIC-SPE-Kartuschen getestet (Details siehe 9.7.5). Dabei konnte DMSP auch aus der Seewasser-Matrix angereichert werden. Für eine Konzentration von 20 nmol L⁻¹ erhält man ein Signal im Bereich der NWG, für 50 nmol L⁻¹ kann eine Quantifizierung vorgenommen werden (Abb. 3.6). Diese Konzentration liegt aber bereits in einem Bereich, der ohne vorherige Aufkonzentrierung analysiert werden kann. Hier müsste die Seewasserprobe lediglich mit internem Standard versetzt und mit Acetonitril verdünnt werden.

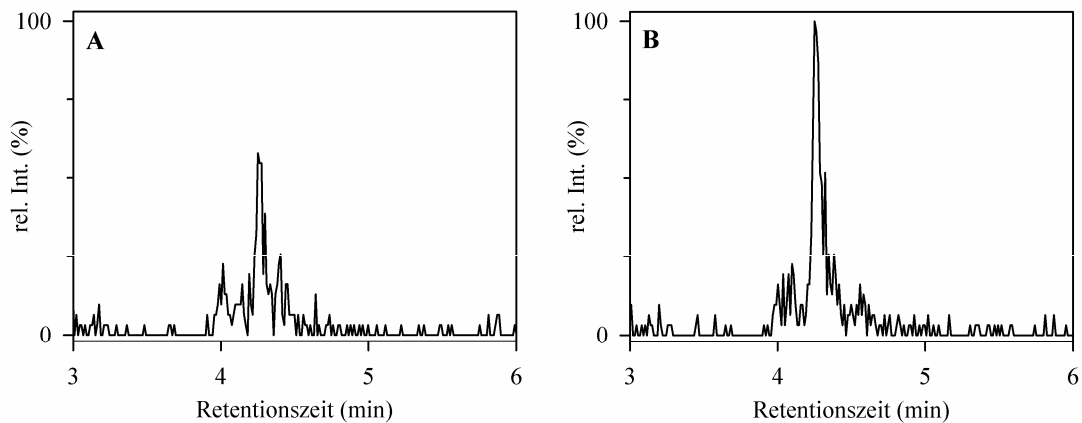


Abb. 3.6: Anreicherung von DMSP aus Meerwasser mittels ZIC-HILIC-SPE; (A) 20 nmol L^{-1} , (B) 50 nmol L^{-1} ; gezeigt ist die Ionenspur von DMSP.

Das Problem bei Verwendung des ZIC-HILIC Materials für eine SPE ist die notwendige Verdünnung der Proben vor der Aufgabe mit Acetonitril. Für einen HILIC-Effekt muss die Probe einen organischen Lösungsmittelanteil von mindestens 50% aufweisen. Damit wird die Seewasserprobe zusätzlich verdünnt, was wiederum eine bessere Anreicherung erfordert. Darüber hinaus zeigten Versuche mit verschiedenen Anteilen des organischen Lösungsmittels (80%, 70% oder 60%, Details siehe 9.7.5), dass eine DMSP-Anreicherung aus der Seewasser-Matrix nur mit deutlichem Überschuss des organischen Lösungsmittels möglich ist (Abb. 3.7).

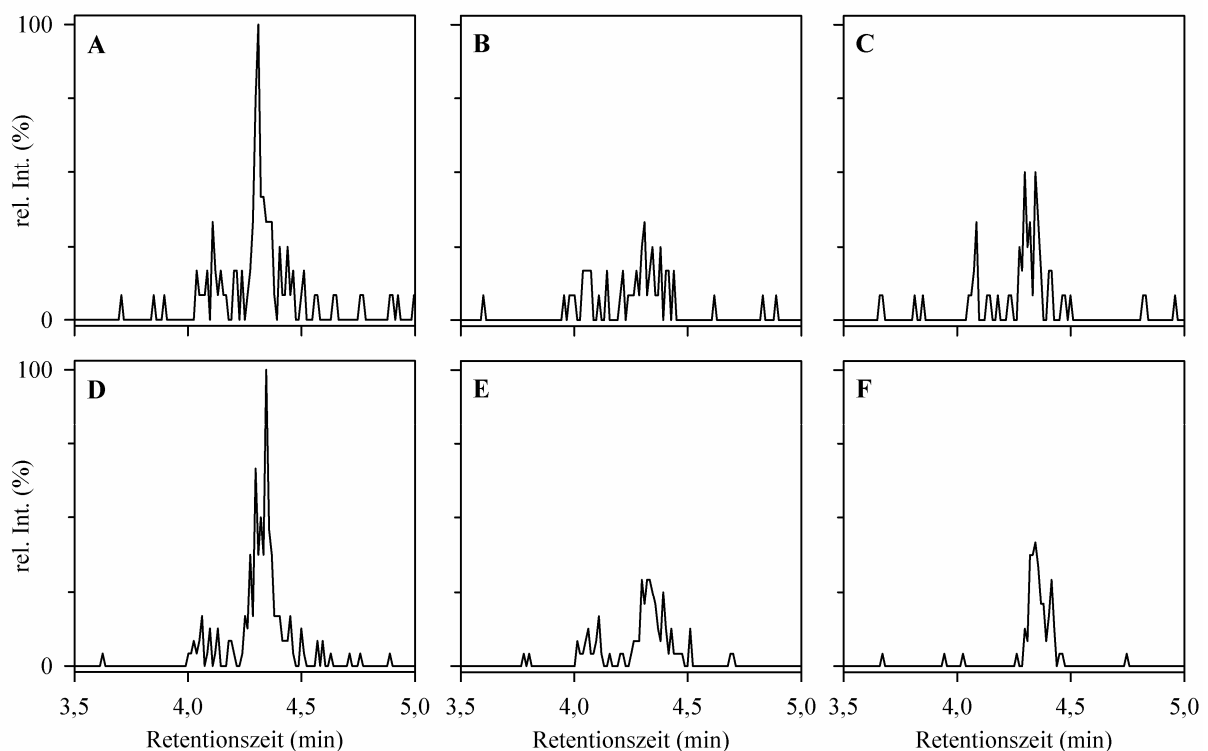


Abb. 3.7: Anreicherung von DMSP aus Meerwasser mittels ZIC-HILIC-SPE; (A,D) 80%, (B,E) 70%, (C,F) 60% organisches Lösungsmittel; (A-C) 20 nmol L^{-1} , (D-F) 50 nmol L^{-1} ; gezeigt ist die Ionenspur von DMSP.

Abschließend bleibt zu der Analyse von DMSPd zu sagen, dass eine Anreicherung von DMSP aus Seewasser nicht trivial ist. Die potentielle Eignung des ZIC-HILIC-Materials für die Extraktion von DMSP aus Seewasser-Matrix konnte gezeigt werden. Allerdings können Konzentration über 40 nmol L^{-1} potentiell auch ohne Anreicherung mit der ZIC-HILIC-Methode analysiert werden. Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoller, die Bestimmungsgrenze der ZIC-HILIC-Methode weiter zu verbessern. Eine Möglichkeit stellt hier die externe Zufuhr von Ameisensäure vor der Schnittstelle von UPLC und Massenspektrometer dar. Dies würde eine bessere Ionisation (bzw. Protonierung der Carboxylatgruppe) bewirken. Im Hinblick auf eine derzeitige BG von 20 nmol L^{-1} könnte dieser Schritt möglicherweise schon ausreichen, um DMSPd-Konzentrationen im Bereich von 10 nmol L^{-1} zu analysieren.

4 DMSP und andere Osmolyten im Phytoplankton

4.1 Vergleich der direkten und indirekten DMSP-Bestimmung

Anhand von zehn Laborkulturen wurde ein Methodenvergleich zwischen der Bestimmung von DMSP nach Derivatisierung (UPLC/MS) und der indirekten Analyse via DMS (SPME-GC/MS) durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob andere DMS-Quellen in Planktonproben vorhanden sind und das Ergebnis der indirekten Bestimmung verfälschen.

Bei Süßwasseralgen (*Scenedesmus obliquus*, *Microcystis aeruginosa*, *Asterionella formosa*) und der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* wurde mit beiden Methoden kein DMSP detektiert bzw. lag DMSP in nicht quantifizierbaren Mengen vor (Tab. 4.1).

Im Gegensatz hierzu traten für die meisten der marinen Phytoplankton-Kulturen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Analysenmethoden auf ($p < 0,01$ oder $p < 0,001$, Datensätze erfüllten Voraussetzungen der Normalverteilung und Varianzenhomogenität für t-Test). In allen Fällen lag die DMS-Konzentration der mit Base behandelten Proben über den mittels UPLC/MS bestimmten DMSP-Konzentrationen (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: DMSP-Zellgehalte im Phytoplankton ermittelt anhand von UPLC/MS und GC/MS

Art (verwendeter Stamm)	pg DMSP pro Zelle		Differenz
	GC	UPLC	
<i>Emiliana huxleyi</i> (RCC 1216)	0,63 (0,02)	0,58 (0,01)	*** - 9%
<i>Emiliana huxleyi</i> (RCC 1217)	0,44 (0,01)	0,38 (0,01)	*** -14%
<i>Emiliana huxleyi</i> (CCMP 1516)	0,43 (0,02)	0,40 (0,01)	* - 7%
<i>Prorocentrum minimum</i>	10,84 (0,38)	9,84 (0,27)	** - 9%
<i>Skeletonema costatum</i> (RCC 75)	0,34 (0,02)	0,33 (0,01)	- 3%
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCMP1335)	0,021 (0,001)	0,020 (0,001)	- 3%
<i>Thalassiosira weissflogii</i> (RCC 76)	< 0,01 (0,00)	< 0,01 (0,00)	---
<i>Asterionella formosa</i> (SAG 8.95)	< 0,01 (0,00)	< 0,01 (0,00)	---
<i>Scenedesmus obliquus</i> (SAG 276-3a)	n.d.	n.d.	---
<i>Microcystis aeruginosa</i> (SAG 18.85)	n.d.	n.d.	---

n.d. – nicht detektiert; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-Test); $n = 4$ (Vorbereitung und Analyse von je vier unabhängigen Proben eines Zellextraktes), Werte in Klammern geben Standardabweichung an

Für jeden Stamm wurde ein Zellextrakt in acht Aliquote aufgeteilt, von denen vier für die Derivatisierung mit anschließender UPLC/MS-Messung und vier für die SPME-GC/MS-Messungen verwendet wurden. Die Standardabweichungen der ermittelten DMSP-Gehalte beinhalten damit den Fehler der Probenvorbereitung ausgehend vom Zellextrakt und werden

nicht von der biologischen Variabilität, Probennahme oder Filtration beeinflusst (RSD UPLC/MS 1,6 bis 4,1%, SPME-GC/MS 2,1 bis 6,7%). Ein Vergleich der direkt bestimmten DMSP-Konzentration und der durch Baseneinwirkung freigesetzten DMS-Konzentration ist somit möglich.

Die zwei Methoden weisen vergleichbare Kalibrationsfunktionen ($y_{\text{UPLC/MS}}=0,0517x$ und $y_{\text{SPME-GC/MS}}=0,0483x$; $R^2>0,995$, y entspricht dem Peakflächenverhältnis $A_{\text{Analyt}}/A_{\text{IS}}$, x entspricht der DMSP-Konzentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$) und Wiederfindungsraten auf (SPME-GC/MS > 90% nach NIKI *et al.* 2004, UPLC/MS 95-105% siehe 3.1.2). Auftretende Differenzen können somit nicht auf unterschiedliche Empfindlichkeiten der Methoden zurückgeführt werden. Die UPLC- und GC-Analysen wurden innerhalb von fünf Tagen durchgeführt. Ein Einfluss der Probenlagerung kann somit als Grund für die beobachteten Unterschiede ausgeschlossen werden (vergleiche hierzu 3.1.2).

Die Abweichungen zwischen den beiden Analysenmethoden müssen auf die Anwesenheit anderer DMS-Vorstufen in den Zellextrakten zurückgehen. DMSP stellt somit nicht die einzige DMS-Quelle in Mikroalgen dar. Die Validierung hat gezeigt, dass die UPLC/MS-Methode robust und das Risiko systematischer Fehler sehr gering ist. Die Zelldichte und damit der Anteil von Matrixbestandteilen haben keinen Einfluss auf das Ergebnis der Derivatisierung. Der Einsatz eines massenselektiven Detektors (MSD) erlaubt die Verwendung eines deuterierten internen Standards, was bei der Analyse von labilen Verbindungen wie DMSP vorteilhaft ist. Die Verwendung des internen Standards D_6 -DMSP gleicht mögliche Verluste während der Lagerung oder Probenvorbereitung aus. Ohne diese Kompensation würde ein zwischenzeitlicher Abbau des DMSP den Anteil anderer stabilerer DMS-Vorstufen künstlich erhöhen.

Der Standard wird mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die nicht-deuterierte Verbindung umgesetzt (SMITH *et al.* 1999). Die C-D-Bindung ist nicht in die Abbaureaktion von D_6 -DMSP zu D_6 -DMS und Acrylsäure involviert. Es wird deswegen angenommen, dass die Verbindung enzymatisch und abiotisch mit ähnlicher Geschwindigkeit wie DMSP umgesetzt wird. Damit können durch D_6 -DMSP sowohl mögliche Verluste aufgrund einer Lyase-Aktivität als auch eines chemischen Abbaus kompensiert werden.

Die Differenzen zwischen den beiden Analysenmethoden lagen bei weniger als 15%, waren aber in den meisten Fällen signifikant. Für eine Übersichtsanalyse von DMSP in natürlichen Proben ist die etablierte indirekte Bestimmung über DMS sicherlich ausreichend. In derartigen Studien werden Fehler von 15% oder mehr oft durch die biologische Variabilität oder durch

Schwierigkeiten bei der Probennahme verursacht (zum Beispiel Reproduzierbarkeit der Probennahme bei Untersuchungen im offenen Ozean). In Studien zur Zellphysiologie werden jedoch oftmals nur geringe Schwankungen der DMSP-Zellgehalte diskutiert. In diesen Fällen sollte überprüft werden, ob auch andere DMS-Vorstufen eine wichtige Rolle spielen. Gleiches gilt für ökologische Untersuchungen oder für Studien, die den Einfluss von Umweltfaktoren auf DMSP testen. Wenn Variationen der DMSP-Werte allein auf Grundlage der indirekten Bestimmungsmethoden diskutiert werden, könnten andere DMS-Vorstufen übersehen und damit deren Bedeutung auf den Schwefel-Metabolismus verkannt werden. Differenzen von 15% scheinen für eine einzelne Kultur wenig relevant zu sein. Auf den weltweiten Schwefelkreislauf bezogen könnten 15% jedoch mehrere Tg Schwefel repräsentieren (KETTLE and ANDREAE 2000), deren Ursprung nicht wie bisher angenommen in DMSP liegt. Über diesen Anteil liegen auf Grundlage der bislang durchgeführten indirekten Messungen keine Kenntnisse vor. Informationen, welche Organismen andere DMS-Vorstufen in welcher Menge und unter welchen Bedingungen produzieren und ob bzw. wie aus diesen Verbindungen DMS freigesetzt wird (enzymatisch und/oder abiotisch), sind somit bisher nicht zugänglich. Derartige Informationen können allein durch direkte Analysenmethoden gewonnen werden.

4.2 Analyse weiterer DMS-Vorstufen

Die entwickelte UPLC/MS-Methode mit vorheriger Derivatisierung kann nicht nur zur Analyse von DMSP, sondern auch von anderen potentiellen DMS-Vorstufen herangezogen werden. Die in Abb. 1.7 aufgeführten Verbindungen weisen wie DMSP eine Carbonsäurefunktion auf. Sie werden während der Derivatisierung wie DMSP in einen PDAM-Ester überführt. Für die Analyse anderer potentieller DMS-Vorstufen ist somit keine weitere Probenvorbereitung notwendig. Durch die Verwendung eines MSD muss für die Quantifizierung keine vollständige chromatographische Trennung erzielt werden, so dass keine Anpassung der Analysenmethode vorgenommen werden muss. Es muss lediglich der Aufnahmebereich des MSD erweitert werden. Die Analyse verschiedener Dimethylsulfonium-Verbindungen wurde exemplarisch für S-Methylmethionin (SMM), 3-Dimethylsulfonium-2-methylpropionat (DMS-2-MP) und 2-Dimethylsulfoniumacetat (DMS-Acetat) durchgeführt (Abb. 4.1 A).

Die vorgestellte HILIC-Methode ist für die Analyse weiterer Vorstufen nur bedingt geeignet. Aufgrund des schnellen Anstiegs des Wasseranteils im Eluenten erfolgt nahezu keine chromatographische Trennung der Substanzen. Die Retentionszeiten der Verbindungen fallen in einem kleinen Bereich zusammen. Substanzen mit gleicher molarer Masse und gleichem Masse/Ladungsverhältnis können somit nicht getrennt und quantifiziert werden (Abb. 4.1 B).

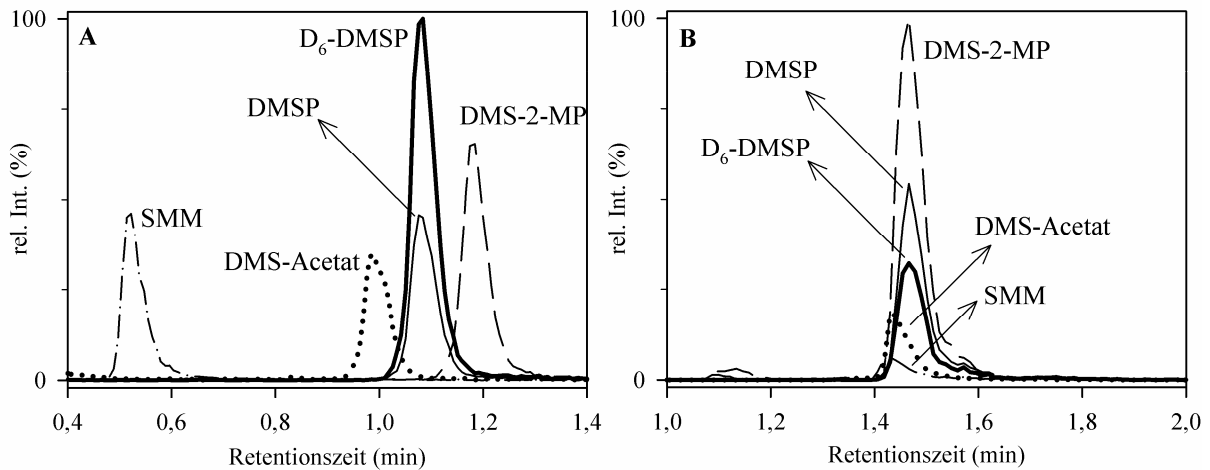


Abb. 4.1: Ionenspuren der UPLC-Trennung verschiedener DMS-Vorstufen (A) nach Derivatisierung mit PDAM (Analytkonzentration $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, interner Standard $\text{D}_6\text{-DMSP}$ $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{L}$ Injektion; gezeigt sind die $[\text{M}]^+$ -Ionen) und (B) mittels HILIC (Analytkonzentration $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, interner Standard $\text{D}_6\text{-DMSP}$ $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{L}$ Injektion; gezeigt sind die $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ionen).

Eine Verbesserung zu den beiden obigen Methoden stellt die Verwendung der ZIC-HILIC-Methode dar (Abb. 4.2). Verschiedene zwitterionische Verbindungen können mit dieser Methode untersucht werden. Die Analyse ist dabei nicht auf Carbonsäuren beschränkt, da im Rahmen der Probenvorbereitung keine Derivatisierung vorgenommen wird.

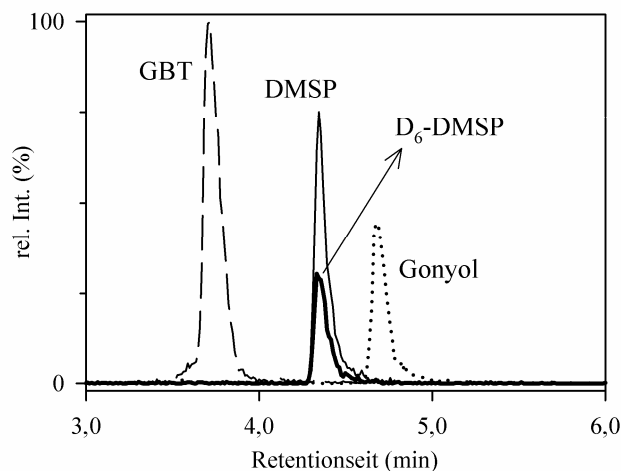


Abb. 4.2: Ionenspuren der UPLC-Trennung verschiedener Osmolyten mittels ZIC-HILIC (Analytkonzentration $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, interner Standard $\text{D}_6\text{-DMSP}$ $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{L}$ Injektion); GBT – Glycinbetain (Struktur Abb. 4.5).

Um einen Hinweis auf andere DMS-Quellen in den Phytoplankton-Kulturen zu erhalten, wurden Extrakte der untersuchten Algenkulturen auf bislang bekannte DMS-Vorstufen untersucht. Sowohl bei dem Dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* als auch bei den drei Kulturen der Kalkalgen *Emiliania huxleyi* wurde in den Chromatogrammen der derivatisierten Proben ein Peak bei m/z 393 mit charakteristischem Schwefel-Isotopenmuster sowie den MS/MS- und UV-Daten eines Pyrenylmethylesters nachgewiesen (MS/MS: Molpeak bei m/z 393, Pyrenylmethyl-

Fragment bei m/z 215, λ_{\max} 343,5 nm). Die Peakintensität betrug bis zu 10% der Intensität des DMSP-Signals (Abb. 4.3 A).

Ein Molpeak von 393 amu würde der derivatisierten Form der aus der Literatur bekannten Verbindung Gonyol oder 4-Dimethylsulfonium-2-methoxybutyrat entsprechen (vgl. Abb. 1.7). Die zwei Verbindungen wurden synthetisiert (9.4.2), derivatisiert und zusammen mit einem Extrakt der Kultur *E. huxleyi* (RCC 1216) injiziert. Die Co-Injektion lieferte im Falle des Gonyols einen Peak. Mit Hilfe der HILIC-Methode wurde eine MS/MS-Analyse eines nicht-derivatisierten Algenextraktes durchgeführt und mit der Standardlösung verglichen. Somit konnte die Anwesenheit von Gonyol im Algenextrakt bestätigt werden (Abb. 4.3 B).

Gonyol wurde bislang in mehreren Dinoflagellaten nachgewiesen, die Biosynthese erfolgt ausgehend von Methionin (NAKAMURA *et al.* 1993 und 1997). Die Funktion von Gonyol ist bislang nicht geklärt. Es wird über eine Wirkung als Osmolyt und Methylgruppen-Donator spekuliert (NAKAMURA *et al.* 1997).

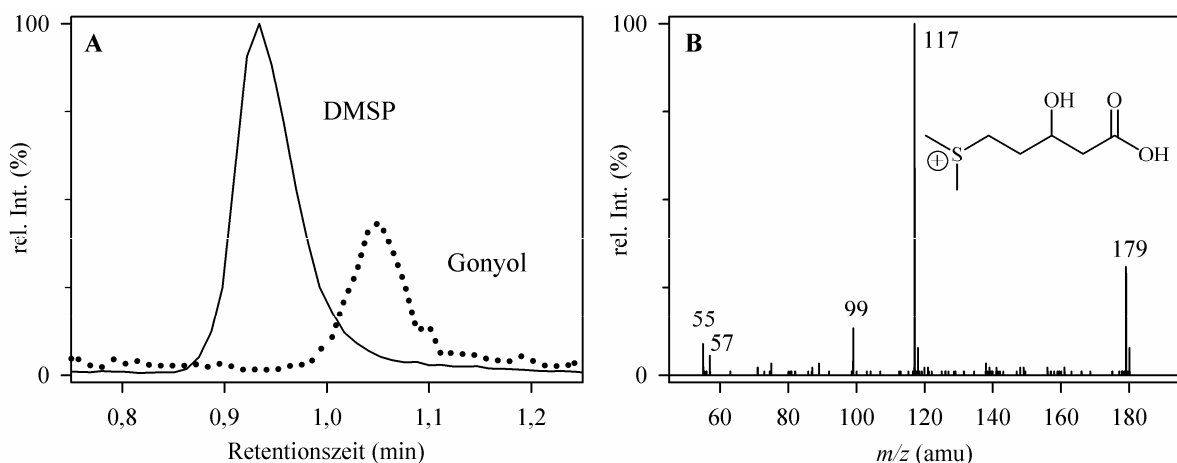


Abb. 4.3: (A) Ionenspuren der PDAM-Derivate von DMSP und Gonyol (10fach vergrößert) in einer Kultur von *E. huxleyi* (RCC 1216); (B) MS/MS des nicht derivatisierten Gonyols in *E. huxleyi* (RCC 1217).

Im Extrakt des Dinoflagellaten *P. minimum* konnte als weitere Dimethylsulfonium-Verbindung DMS-Acetat nachgewiesen werden (Abb. 4.4). DMS-Acetat ist das Schwefel-Homolog zu GBT und wirkt wie diese Verbindung als Osmolyt (CHAMBERS *et al.* 1987). DMS-Acetat wurde unter anderem in Extrakten der Grünalge *Ulva lactuca* nachgewiesen (PICHEREAU *et al.* 1998).

Standardlösungen von SMM, DMS-2-MP, DMS-Acetat und Gonyol wurden im Hinblick auf eine mögliche DMS-Freisetzung nach Behandlung mit konzentrierten Basen untersucht. Damit sollte der mögliche Einfluss dieser Verbindungen auf die indirekte DMSP-Bestimmung ermittelt werden. Die Proben wurden dabei jeweils nach 10 Minuten, 1, 2 und 4 Stunden mit der SPME-GC/MS-Methode analysiert. Jede Verbindung war in der Lage DMS freizusetzen. Im

Unterschied zu DMSP fand aber keine vollständige Umsetzung zu DMS und den entsprechenden Carbonsäuren statt. Für SMM, DMS-Acetat und Gonyol waren unabhängig von der Inkubationszeit 2-4% der Substanz zu DMS umgesetzt. Für DMS-2-MP wurde nach 10 Minuten ein Umsatz von 7%, nach 4 Stunden von 71% ermittelt.

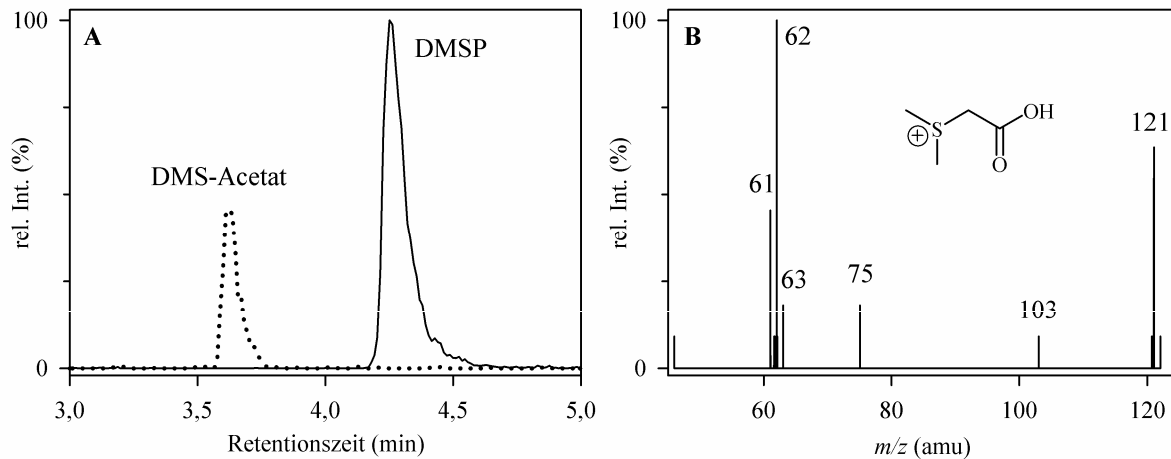


Abb. 4.4: (A) Ionenspur von DMSP und DMS-Acetat (5fach vergrößert); (B) MS/MS-Spektrum von DMS-Acetat; Daten aufgenommen auf ZIC-HILIC mit einer Kultur von *P. minimum*.

Die Peakflächen des Gonyols und DMS-Acetats sind um Faktor 10 kleiner als die des DMSP. Berücksichtigt man die geringe DMS-Freisetzung können die beiden Verbindungen nicht allein die Ursache für die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Analysemethoden sein. Es müssen weitere DMS-Vorstufen in den Proben vorliegen. Es wäre denkbar, dass auch Verbindungen mit höherem Molekulargewicht Dimethylsulfonium-Gruppen enthalten, die DMS nach Baseneinwirkung freisetzen können. Die Isolierung und Strukturaufklärung dieser Verbindungen wurde jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

4.3 Analyse anderer Osmolyten

ANDREAE (1986) stellte die Hypothese auf, dass DMSP unter Nitrat-limitierenden Bedingungen stickstoffhaltige Osmolyten wie Glycinbetain (GBT) ersetzen könnte. In mehreren Studien wird ein erhöhter DMSP-Gehalt der Zelle vor diesem Hintergrund diskutiert. Oftmals wird jedoch nur der DMSP-Gehalt ermittelt, so dass keine Informationen über den GBT-Gehalt vorliegen und nur Vermutungen geäußert werden können (TURNER *et al.* 1988, STEFELS und VAN BOEKEL 1993, BUCCIARELLI und SUNDA 2003). KELLER *et al.* (1999a und 1999b) quantifizierten beide Verbindungen, verwendeten hierfür aber zwei verschiedene Methoden.

Analog zu anderen DMS-Vorstufen wird auch GBT im Rahmen der Probenvorbereitung mit PDAM unter Bildung des entsprechenden Esters derivatisiert. Damit steht eine Methode zur

Verfügung, die für die simultane Analytik der oben aufgeführten Metaboliten und GBT geeignet ist. Ebenso können die beiden entwickelten (ZIC-)HILIC-Methoden für die Analyse von GBT herangezogen werden (Abb. 4.5).

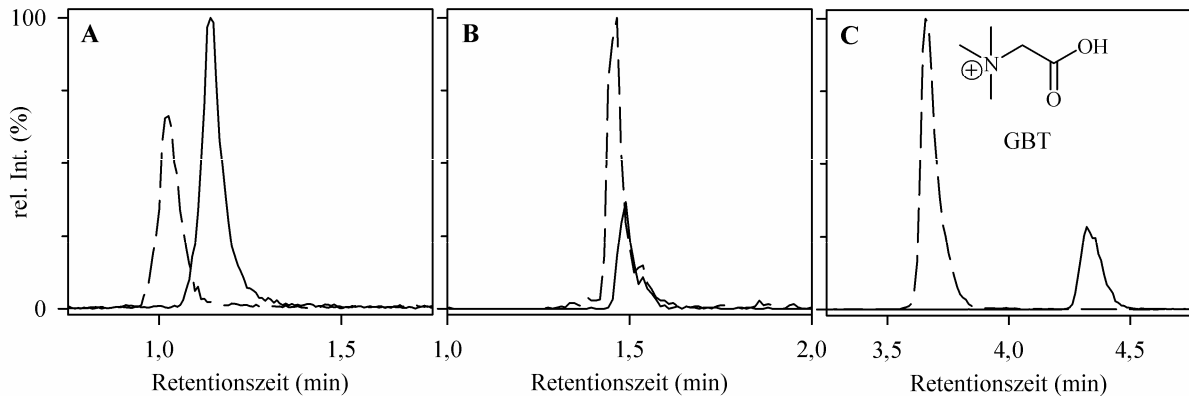


Abb. 4.5: Analyse von GBT und DMSP in verschiedenen Kulturen von *T. pseudonana* (A) als PDAM-Derivate, (B) mittels HILIC, (C) mittels ZIC-HILIC; durchgezogene Linie zeigt Ionenspur von DMSP, gestrichelte Linie von GBT; unterschiedliche Peakverhältnisse gehen auf biologische Variabilität zurück.

Anhand von 15 marinen Phytoplankton-Kulturen wurde die Derivatisierungsmethode für die Analyse von DMSP und GBT angewendet (Tab. 4.2). Die Kulturen konnten dabei in vier Gruppen unterteilt werden. Ein Teil der untersuchten Arten produzierte weder DMSP noch GBT. Kulturen wie zum Beispiel der Haptophyt *Prymnesium parvum* produzierten nur DMSP. Die Diatomee *T. weissflogii* (RCC76) wies als einzige Alge kein DMSP, aber im Vergleich zu den anderen Kulturen hohe GBT-Werte auf.

Beide Osmolyten wurden von einem der untersuchten Prymnesiophyten, dem Chryptophyten und Dinoflagellaten produziert. Auch Diatomeen können beide Verbindungen enthalten. Das Verhältnis der beiden Verbindungen lag dabei zwischen 0,7 und > 50 (berechnet als das Verhältnis von fmol DMSP zu fmol GBT pro Zelle).

Diatomeen werden allgemein als schwache DMSP-Produzenten angesehen (KELLER *et al.* 1989). Es zeigte sich aber, dass einige Arten beträchtliche Mengen an DMSP produzieren können, die mit den Werten sogenannter starker DMSP-Produzenten vergleichbar sind (Tab. 4.2).

Die Kulturen für den Methodenvergleich und die DMSP-/GBT-Analytik wurden unabhängig voneinander innerhalb eines Jahres angesetzt. Hierfür wurden zwei verschiedene Protokolle für die Kultivierung angewendet (siehe 9.8 und 9.9). Beobachtete Unterschiede für gleiche Stämme in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 können somit auf biologische Variabilität zurückgeführt werden. Derartige Schwankungen können aber nicht nur von dem jeweiligen Stamm und den Kultivierungsbedingungen, sondern auch von der Wachstumsphase abhängen. KELLER *et al.*

(1999a) fanden für eine Kultur von *P. minimum* einen maximalen DMSP-Gehalt zu Beginn der exponentiellen Phase, der sich im weiteren Verlauf um bis zu Faktor 4 verringerte. Daher können unterschiedliche Probennahmepunkte innerhalb der exponentiellen Phase eine Ursache für die Differenzen zwischen den beiden Studien sein.

Tab. 4.2: DMSP- und GBT-Gehalte in marinen Phytoplankton-Kulturen

Art (Stamm)	pg DMSP / Zelle	pg GBT / Zelle
<i>Amphiphrora paludosa</i>	n.d.	n.d.
<i>Chaetoceros gracilis</i>	n.d.	< 0,01 (0,00)
<i>Navicula</i> sp.	< 0,01 (0,00)	n.d.
<i>Pavlova lutheri</i>	n.d.	0,03 (0,00)
<i>Rhodomonas</i> sp.	n.d.	0,94 (0,15)
<i>Thalassiosira weissflogii</i> (RCC76)	n.d.	2,60 (0,53)
<i>Chaetoceros didymus</i>	0,07 (0,01)	n.d.
<i>Prymnesium parvum</i>	2,27 (0,13)	< 0,01 (0,00)
<i>Skeletonema costatum</i> (RCC75)	0,27 (0,05)	< 0,01 (0,00)
<i>Skeletonema marinoi</i> (G4)	0,34 (0,03)	< 0,01 (0,00)
<i>Cryptochloris</i> sp.	0,55 (0,01)	0,03 (0,00)
<i>Isochrysis galbana</i>	0,38 (0,02)	0,02 (0,00)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> (UTEX646)	0,11 (0,03)	0,14 (0,03)
<i>Prorocentrum minimum</i>	34,86 (3,17)	6,96 (1,11)
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCMP1335)	0,13 (0,00)	0,09 (0,01)

n.d. - nicht detektiert, Mittelwert (n = 3) von drei unabhängige Kulturen, Werte in Klammern geben Standardabweichung an

Während im Rahmen dieser Untersuchung für *P. minimum* ein GBT-Gehalt von knapp 7 pg pro Zelle gefunden wurde, berichteten KELLER *et al.* (1999a), dass *P. minimum* (CCMP 1329) kein GBT produziert. Die GBT-Produktion scheint damit nicht nur von der Art, sondern auch von dem jeweiligen Stamm abhängig zu sein. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass der GBT-Gehalt der Zelle im Verlauf einer Zellkultur variiert und die ermittelten Werte von dem jeweiligen Probennahmepunkt abhängen (KELLER *et al.* 1999a). Unterschiede zu KELLER *et al.* (1999a) können damit auch Folge verschiedener Probennahmepunkte im Verlauf der exponentiellen Phase sein.

5 DMSP-Gehalt im Verlauf einer Zellkultur

5.1 Bisherige Studien

Trotz der Bedeutung von DMSP und den vielfältigen Studien über diesen Metaboliten liegen derzeit nur wenige Informationen über die Dynamik des DMSP-Zellgehaltes vor. Bezogen auf das Zellvolumen kann die intrazelluläre DMSP-Konzentration unter $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ bis über 400 mmol L^{-1} betragen (KELLER *et al.* 1989). Diese großen Unterschiede können vor allem auf Grundlage der Taxonomie erklärt werden. Jedoch führen auch äußere Faktoren zu beträchtlichen Schwankungen des zellulären DMSP (STEFELS und VAN LEEUWE 1998, van RIJSEL und GIESKES 2002, ARCHER *et al.* 2010). BUCCIARELLI *et al.* (2007) führten anhand der Kalkalge *Emiliana huxleyi* eine 28 Stunden-Studie durch. Dabei stellten sie fest, dass der DMSP-Zellgehalt im Tagesverlauf deutliche Schwankungen zeigt. Neben diesen tageszeitbedingten Schwankungen können auch wachstumsphasenabhängige Unterschiede beobachtet werden. STEFELS und VAN BOEKEL (1993) fanden für batch-Kulturen von *Phaeocystis* sp. in der stationären Phase höhere DMSP-Gehalte als in der exponentiellen Phase.

DMSP dient in Algen unter anderem zur Regulierung des osmotischen Drucks. Daneben sind andere zwitterionische Verbindungen wie Glycinbetain (GBT) bekannt, die anstelle von oder neben DMSP für die Osmoregulation herangezogen werden (DICKSON und KIRST 1986, KELLER *et al.* 1999a und 1999b). ANDREAE (1986) äußerte die Vermutung, dass bei Nährstoffarmut DMSP andere stickstoffhaltige Osmolyten wie GBT ersetzen könnte. Mehrere Studien haben sich mit dieser Hypothese befasst. KELLER *et al.* (1999a und 1999b) untersuchten DMSP und GBT in Phytoplankton-Kulturen (Diatomeen, Prymnesiophyten, Dinoflagellaten) unter Nitrat-reichen und Nitrat-limitierten Bedingungen. Sie konnten dabei keinen reziproken Zusammenhang zwischen DMSP und GBT feststellen. GBT schien aber mit der Verfügbarkeit von Stickstoff zu korrelieren (KELLER *et al.* 1999b). *Thalassiosira oceanica* wies unter Nitrat-limitierten Bedingungen höhere DMSP-Werte auf. In Kombination mit erhöhter UV-Strahlung wurde dieser Effekt jedoch nicht beobachtet (HARADA *et al.* 2009).

Diatomeen werden allgemein als schwache DMSP-Produzenten angesehen (KELLER *et al.* 1989). Einige Arten können aber DMSP-Werte aufweisen, die mit starken DMSP-Produzenten vergleichbar sind (siehe Tab. 4.2). Diatomeen sind im aquatischen Ökosystem weit verbreitet und tragen maßgeblich zur globalen Primärproduktion im Meer bei (NELSON *et al.* 1995). Aus diesem Grund ist es wichtig den Beitrag von Diatomeen zu dem DMSP-Haushalt in den Ozeanen

zu verstehen. Es wurde bereits beobachtet, dass der DMSP-Zellgehalt auch in Diatomeen stark variieren kann. KASAMATSU *et al.* (2004) fanden für Kulturen von *Navicula* sp. und *Nitzschia* sp. während der exponentiellen Phase niedrigere DMSP-Zellgehalte als während der stationären Phase. BUCCIARELLI und SUNDA (2003) untersuchten für die Diatomee *T. pseudonana* den Einfluss von Nährstofflimitierungen auf den DMSP-Gehalt. Nitrat-Limitierung führte zu erhöhten DMSP-Werten, aber eine Limitierung durch Silikat, CO₂ oder Phosphat verursachte ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären DMSP. Diese Ergebnisse zeigen, dass der DMSP-Zellgehalt auch in Diatomeen von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Untersuchungen, die den Einfluss von nur einem Parameter analysieren, liefern unter Umständen kein umfassendes Bild über die Veränderungen des DMSP-Zellgehaltes als Reaktion auf äußere Faktoren. Vor allem die Abhängigkeit des intrazellulären DMSP von dem Licht-Dunkel-Zyklus und der Wachstumsphase kann auf Grundlage der bisherigen Datensätze nicht ausreichend bewertet werden.

Aus diesem Grund wurde angestrebt den komplexen Einfluss von Stickstoff-Verfügbarkeit, Tagesverlauf und Wachstumsphase auf den DMSP-Zellgehalt aufzuklären. Die Studie erfolgte anhand von batch-Kulturen, um fortlaufende Veränderungen im Verlauf einer Zellkultur beobachten zu können. Als Modellorganismus wurde die weltweit verbreitete Diatomee *Skeletonema marinoi* ausgewählt. Diese Art wurde bereits in anderen Studien als Modellorganismus für die Untersuchung der Diatomeen-Physiologie und -Ökologie verwendet (KOOISTRA *et al.* 2008, PRINCE *et al.* 2008, BAROFSKY *et al.* 2010).

Bisherige Studien, die sich mit dem Einfluss von Nitrat auf DMSP in verschiedenen Arten beschäftigt haben, haben unterschiedliche Nitrat-Konzentrationen im Medium verwendet (TURNER *et al.* 1988, 242 und $< 1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$; GRÖNE und KIRST 1992, 1000 und $0 \mu\text{mol L}^{-1}$; BUCCIARELLI und SUNDA 2003, 64 und $9 \mu\text{mol L}^{-1}$; SUNDA *et al.* 2007, 32 und $6,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Für die folgende Studie wurden Inokulationsbedingungen von $630 \mu\text{mol L}^{-1}$ (N+) und $63 \mu\text{mol L}^{-1}$ Nitrat (N-) gewählt. Es war so möglich die Entwicklung einer batch-Kultur mit einer hohen Nitrat-Anfangskonzentration mit dem Verlauf einer Kultur ausgehend von einem niedrigen Nitrat-Niveau zu vergleichen. Unter den gewählten N+ Bedingungen konnten Nitrat-limitierende Effekte zu Beginn der Kultivierung ausgeschlossen werden. Damit war eine Beobachtung des DMSP unabhängig von einer Stickstoff-Limitierung möglich.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Im nachfolgenden Abschnitt wird zwischen N+ Kulturen und N- Kulturen unterschieden. Diese Bezeichnungen beziehen sich auf die Nährstoffsituation zum Zeitpunkt der Inokulation. Die Begriffe Nitrat-reich, -limitiert und -verarmt beziehen sich auf die Nährstoffsituation am jeweiligen Probennahmepunkt.

Die N+ und N- Kulturen wurden als Triplikate angesetzt, jede Kultur wurde in einem Volumen von insgesamt 11 Liter inokuliert (detaillierte Ausführungen sind in 9.10 zusammengefasst).

5.2.1 Allgemeine Parameter

Die drei N- Kulturen und eine der N+ Kulturen gingen am Tag 6 nach der Inokulation in die stationäre Wachstumsphase über, die übrigen N+ Kulturen am Tag 7. Um einen direkten Vergleich der Replikate zu ermöglichen, wurde der Datensatz der einen N+ Kultur um einen Tag verschoben (erreichen der stationären Phase am Tag 7). Die Daten der N+ Kulturen konnten so für die weitere statistische Auswertung gemittelt werden.

N+ Kulturen erreichten höhere Zellzahlen als N- Kulturen (Abb. 5.1 A und G). Beide Behandlungen zeigten während der exponentiellen Phase in der Dunkelperiode höhere Zellteilungsraten als in der Lichtperiode. Dieser Trend war für N- Kulturen stärker ausgeprägt.

Das Medium beider Behandlungen verarmte im Laufe des Experiments an Nitrat (Absinken der Nitrat-Konzentration unter die Nachweisgrenze von $5 \mu\text{mol L}^{-1}$). In beiden Fällen konnten daraufhin physiologische Veränderungen beobachtet werden (siehe unten). Das Medium der N- Kulturen verarmte im Laufe von Tag 4 an Nitrat (Abb. 5.1 G), die Kulturen setzten aber bezogen auf die Zellteilung noch zwei Tage ihr Wachstum fort. Die Bereitstellung von Stickstoff aus anderen Quellen wie Aminosäuren oder Proteinen ist eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung (DORTCH *et al.* 1984). Für Kulturen von *S. costatum* wurde berichtet, dass diese Nitrat intrazellulär speichern können (COLLOS 1982b, MARTINEZ 1991, LOMAS und GLIBERT 2000). Somit kann das Wachstum auch auf Grundlage dieses Stickstoff-Pools stattgefunden haben.

COLLOS (1998 und enthaltene Referenzen) berichtete für eine Vielzahl von Phytoplankton-Arten eine Abgabe von Nitrit in das Medium, welches im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder aufgenommen wurde. Das gleiche Phänomen konnte in dieser Studie beobachtet werden (Abb. 5.1 F und L). Für N+ Kulturen wurde im Verlauf der exponentiellen Phase ein Anstieg der Nitrit-Konzentration im Medium auf bis zu $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ erfasst. Die Nitrit-Aufnahme fand zu Beginn der stationären Phase am Tag 8 statt und verlief innerhalb von 4 Stunden nahezu quantitativ.

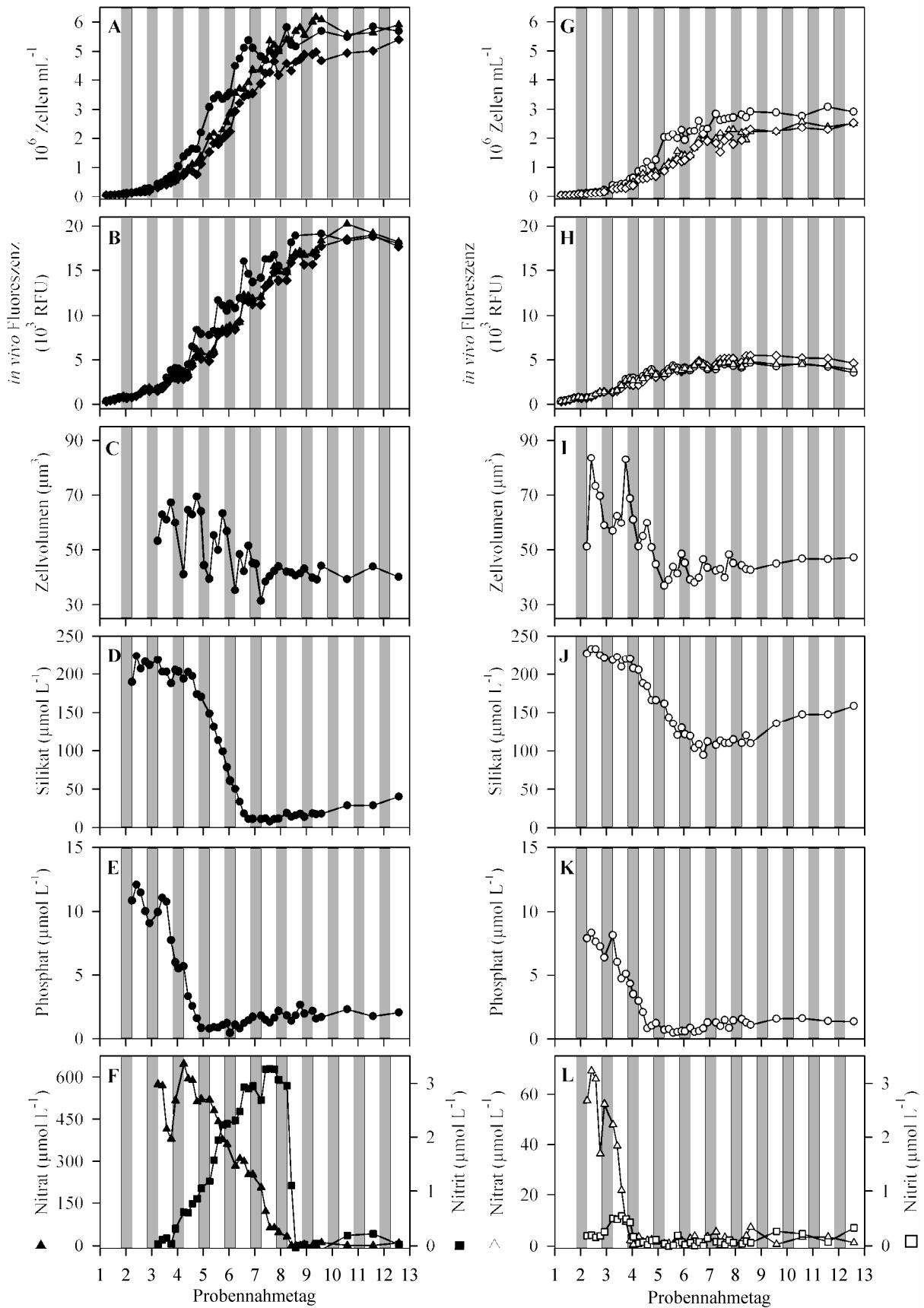


Abb. 5.1: Allgemeine Parameter der *Skeletonema marinoi* batch-Kulturen. Graphen links (schwarze Symbole) zeigen N+ Kulturen, Graphen rechts (weiße Symbole) N- Kulturen. Die grauen Balken zeigen Dunkelperiode. (A, G) Zellzahlen und (B, H) *in vivo* Fluoreszenz der unabhängigen Kulturen, (C, I) Zellvolumen, (D, J) Silikat und (E, K) Phosphat im Medium (Mittelwert von $n = 3$, Fehlerbalken aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt), (F, L) Nitrat und Nitrit im Medium jeweils einer Kultur.

Zu Beginn der Nitrit-Aufnahme lag die Nitrat-Konzentration im Medium unter $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Der Grenzwert der Nitrat-Konzentration im Medium, bei der eine Nitrit-Aufnahme einsetzt, kann zwischen $0,3$ und $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ betragen. Die Nitrit-Aufnahme muss somit nicht mit einer Nitrat-Verarmung des Mediums einhergehen (COLLOS 1982a und enthaltene Referenzen).

Auch im Fall der N- Kulturen wurde ein Anstieg der Nitrit-Konzentration im Medium beobachtet. Der Wert lag mit $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ aber unterhalb des in den N+ Kulturen beobachteten Wertes. Die Aufnahme des Nitrits erfolgte bereits in der frühen exponentiellen Phase, parallel zur Nitrat-Verarmung des Mediums.

Für beide Behandlungen verarmte das Medium im Verlauf von Tag 4 an Phosphat (Abb. 5.1 E und K). Das Medium der N+ Kulturen war am Tag 6 an Silikat erschöpft. N- Kulturen verbrauchten nur die Hälfte des anfangs zugefügten Silikats (Abb. 5.1 D und J).

Das Zellvolumen wurde für jeweils eine N+ und N- Kultur bestimmt. Für beide Behandlungen nahm das Zellvolumen nach der Inokulation ab (Abb. 5.1 C und I). Nach dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase blieb das Zellvolumen nahezu konstant. Für die N+ Kultur konnte während der exponentiellen Phase ein ausgeprägtes Muster im Tagesverlauf beobachtet werden, das eine beträchtliche Veränderung des Zellvolumens zeigt (Steigerung um Faktor 1,26 bis 1,68 von 6 Uhr bis 18 Uhr). Die Zellen wiesen jeweils zu Beginn der Lichtperiode die kleinste Größe auf. Das Maximum wurde um 18 Uhr erreicht. Bei der N- Kultur waren die Schwankungen im Tagesverlauf weniger ausgeprägt. In der frühen exponentiellen Phase lag um 6 Uhr das geringste Zellvolumen vor. Das Maximum wurde im Verlauf der Lichtperiode erreicht. Nachdem das Medium an Nitrat verarmt war, nahm das mittlere Zellvolumen innerhalb eines Tages deutlich ab (Faktor 1,4).

HUDSON und MOREL (1990) diskutierten eine Verringerung der Zellgröße und damit ein erhöhtes Oberflächen-Volumen-Verhältnis als mögliche Anpassungsreaktion an nährstofflimitierte Bedingungen. Dies kann die deutliche Volumenabnahme der N- Zellen nach Nitrat-Verarmung des Mediums erklären. Ein Vergleich der Zellvolumina der N+ und N- Kulturen zeigte jedoch, dass für mehrere Probennahmepunkte die N- Zellen ein höheres Zellvolumen aufwiesen als die N+ Zellen. Ein Trend bzw. ein Muster konnte dabei nicht ausgemacht werden. Dies deutet darauf hin, dass neben einer Stickstoff-Limitierung andere Faktoren das Zellvolumen beeinflussen. Diese limitierenden Faktoren könnten aufgrund der höheren Zelldichte in der N+ Kultur schneller verbraucht sein als in der weniger dichten N- Kultur (vgl. Abb. 5.1 A und G). Eine derartig komplexe Entwicklung des Zellvolumens wird auch durch LITCHMAN *et al.* (2009 und enthaltene Referenzen) unterstützt. Sowohl eine längerfristige Stickstoff-Limitierung als auch eine hohe Stickstoff-Verfügbarkeit führen zu kleinen Zellvolumina, letzteres aufgrund höherer

Zellteilungsraten. Die Inokulationskultur für die N- Behandlung wurde im Vorfeld nicht für längere Zeit unter den limitierten Bedingungen gehalten. Es ist somit möglich, dass aufgrund einer langsamen Adaption an die Stickstoff-Limitierung eine Überlagerung verschiedener Effekte beobachtet wurde.

In der exponentiellen Phase stieg die *in vivo* Fluoreszenz für beide Behandlungen während der Lichtperiode an. Während der Dunkelperiode blieb sie konstant oder nahm ab (Abb. 5.1 B und H). Für die N+ Kulturen zeigt die *in vivo* Fluoreszenz über das gesamte Experiment hinweg eine gute Korrelation mit der Zellzahl an den jeweiligen Probennahmepunkten ($R^2 = 0,877$ bis $0,949$). Im Falle der N- Kulturen ist die Korrelation der beiden Parameter ähnlich hoch, wenn die Datenpunkte aus der exponentiellen Phase berücksichtigt werden ($R^2 = 0,831$ bis $0,915$). Im Gegensatz zu den N+ Kulturen nahm die *in vivo* Fluoreszenz der N- Kulturen wenige Tage nach dem Erreichen der stationären Phase ab. Die Zellzahl blieb in dieser Zeit konstant. Somit konnte über das gesamte Experiment in den N- Kulturen keine Korrelation zwischen der *in vivo* Fluoreszenz und der Zellzahl beobachtet werden ($R^2 = 0,214$ bis $0,353$).

Eine derartige Abnahme der *in vivo* Fluoreszenz wurde auch von BUCCIARELLI und SUNDA (2003) bei einer Studie mit der Diatomee *T. pseudonana* beobachtet. LATASA und BERDALET (1994) fanden in Nitrat-erschöpften Zellen des Dinoflagellaten *Heterocapsa* sp. einen verringerten Anteil von Pigmenten wie zum Beispiel Chlorophyll a vor. Sie diskutierten einen Effekt der Nitrat-Erschöpfung auf die Translation der RNA und damit auf die Proteinsynthese. Dies würde auch die Synthese von Pigmenten beeinflussen und zu einer geringeren Menge an Pigmenten führen (LATASA und BERDALET 1994, BERDALET *et al.* 1994). Diese Beobachtung zeigt, dass eine Nitrat-Limitierung größere Veränderungen im Zellmetabolismus verursacht, die sich sowohl auf den Primär- als auch auf den Sekundärmetabolismus auswirken.

5.2.2 DMSP im Tagesverlauf

Im Fall der N+ Kulturen konnte für den DMSP-Gehalt pro Zelle ein ausgeprägtes Muster im Tagesverlauf beobachtet werden (Abb. 5.2 A und C). Für Proben, die im 6 Uhr genommen wurden, wurden die niedrigsten Werte ermittelt. Während der Lichtperiode stieg der DMSP-Zellgehalt an, das Maximum wurde am Ende der Lichtperiode bzw. zu Beginn der Dunkelperiode erreicht. Im Verlauf der Dunkelperiode nahm der DMSP-Zellgehalt ab. Das Muster konnte über einen Zeitraum von vier Tagen während der exponentiellen Phase beobachtet werden. Dies deutet auf einen sehr dynamischen DMSP-Metabolismus während des Licht-Dunkel-Zyklus hin. Der mittlere DMSP-Gehalt pro Zelle und Tag war während der exponentiellen Phase konstant ($0,139$ bis $0,143$ pg Zelle⁻¹, Tag 3 bis 5, $p > 0,1$). Betrachtet man die einzelnen Probennahme-

punkte im Tagesverlauf (zum Beispiel 10 Uhr), treten für Tag 3 bis 6 keine signifikanten Unterschiede auf (Tag 3 bis 5 für 22 Uhr, $p > 0,1$). Die um 6 Uhr genommenen Proben unterscheiden sich jeweils signifikant von den Proben, die um 14, 18 und 22 Uhr genommen wurden (paarweiser Vergleich, $p < 0,05$).

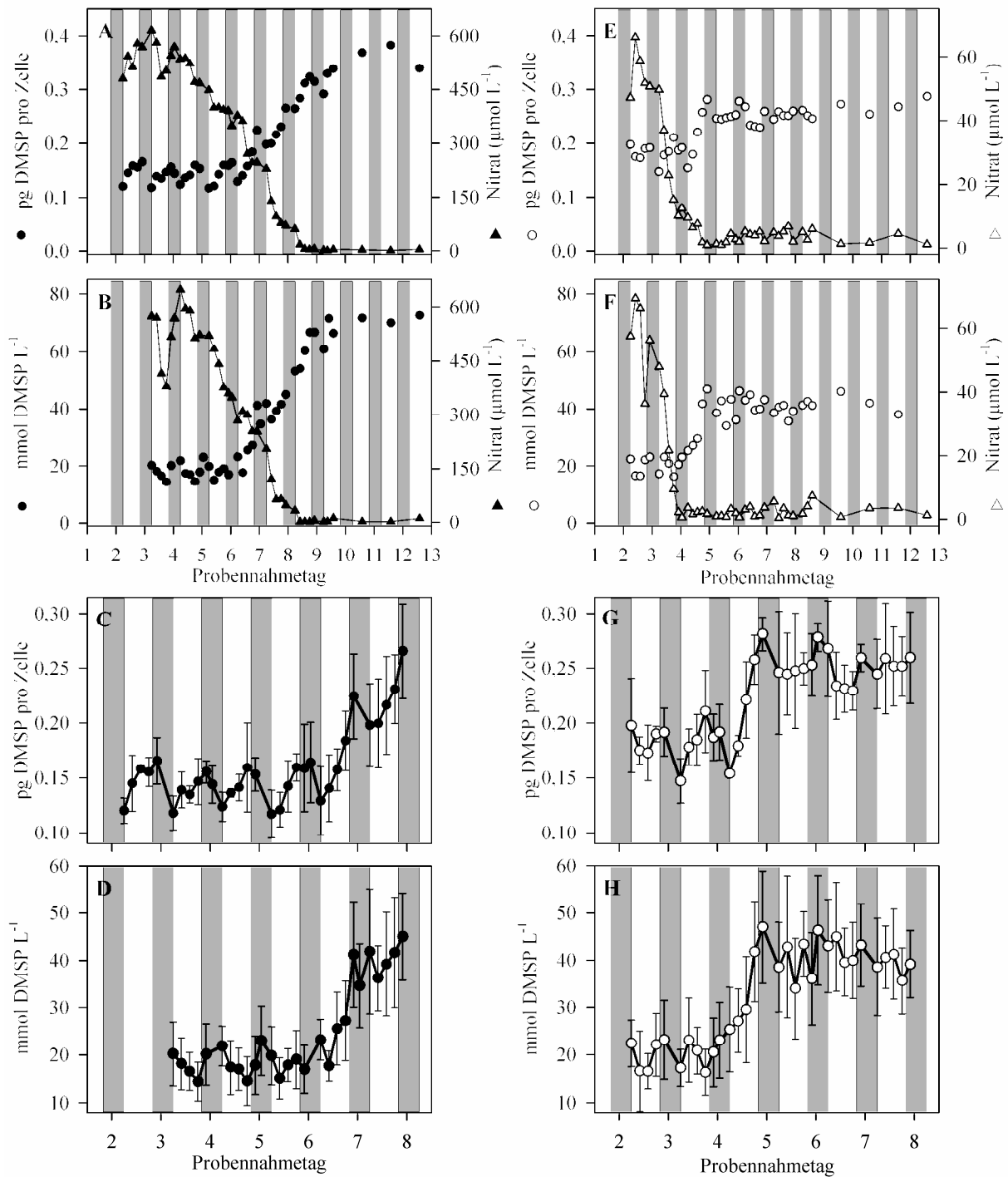


Abb. 5.2: Entwicklung von DMSP im Tagesverlauf in der exponentiellen und frühen stationären Phase; (A, E) DMSP-Gehalt pro Zelle im Vergleich zu Nitrat im Medium (Mittelwert von $n = 3$ Kulturen), (B, F) intrazelluläre DMSP-Konzentration im Vergleich zu Nitrat im Medium ($n = 1$ Kultur mit 10 bis 20 vermessen Zellen), (C, G) und (D, H) vergrößerte Ansicht von (A, E) bzw. (B, F), Fehlerbalken zeigen Standardabweichung; schwarze Symbole zeigen N+, weiße Symbole N- Kulturen; Kreise zeigen den jeweiligen DMSP-Wert, Dreiecke die Nitrat-Konzentration im Medium; graue Balken zeigen die Dunkelperiode.

In Bezug auf die intrazelluläre DMSP-Konzentration kehrt sich der oben beschriebene Tagesverlauf um (Abb. 5.2 B und D). Das Muster ist jedoch weniger stark ausgeprägt. Während der exponentiellen Phase wiesen die um 6 Uhr genommenen Proben die höchste intrazelluläre DMSP-Konzentration des jeweiligen Tages auf. Im Verlauf der Lichtperiode nahm die intrazelluläre DMSP-Konzentration ab und stieg während der Dunkelperiode wieder an (Abb. 5.2 D). Ein ähnlicher Verlauf wurde für die Kalkalge *E. huxleyi* gefunden (BUCCIARELLI *et al.* 2007), was auf einen ähnlichen Regulierungsmechanismus schließen lässt. BUCCIARELLI *et al.* (2007) diskutierten die antioxidative Funktion von DMSP und seiner Abbauprodukte (SUNDA *et al.* 2002) als Grund für die höchste intrazelluläre DMSP-Konzentration zu Beginn der Lichtperiode. Die Zelle ist zu diesem Zeitpunkt einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt. Eine derartige Schutzfunktion wird auch durch diese Studie unterstützt. Da während der exponentiellen Phase eine niedrige intrazelluläre DMSP-Konzentration vorliegt, könnte ein tageszeitabhängiger DMSP-Verlauf erforderlich sein, um Stresssituation zu überstehen. So kann zu Beginn der Lichtperiode die DMSP-Konzentration erreicht werden, die für eine Schutzfunktion notwendig ist. Tageszeitabhängige Muster wurden im Zusammenhang mit oxidativem Stress bereits für Enzyme beobachtet. So zeigen Isoformen der Superoxid Dismutase zu Beginn der Lichtperiode die höchste Aktivität (OKAMOTO und COLEPICOLO 2001).

Das in dieser Studie beobachtete ausgeprägte Muster suggeriert, dass DMSP von einer inneren Uhr beeinflusst wird. Daneben könnte eine durch Licht oder Oxidantien beeinflusste Regulierung die DMSP-Konzentration kontrollieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Gonyaulin (siehe Abb. 1.7) in die Regulierung des Tagesrhythmus des Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* involviert ist (ROENNEBERG *et al.* 1991). Vergleichbare Funktionen wurden für DMSP bislang nicht berichtet.

Kurz vor dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase fand ein Anstieg der beiden DMSP-Parameter statt. Dieser war für die intrazelluläre DMSP-Konzentration stärker ausgeprägt als für den DMSP-Gehalt pro Zelle (Abb. 5.2 A und B). In beiden Fällen setzte der Anstieg vor einer Nitrat-Verarmung des Mediums ein. DMSP-Zellgehalte waren von Beginn der stationären Phase an (Tag 7, 22 Uhr) signifikant höher als die Werte der vorangegangenen Probennahmepunkte (Vergleich mit Tag 4, 14 Uhr, $p < 0,01$). Im Fall der intrazellulären DMSP-Konzentration wurden die Werte von jedem Tag gemittelt und verglichen. Die Tage 3 bis 5 wiesen signifikant niedrigere Werte als die nachfolgenden Tage auf ($p < 0,05$).

Ab einem Anstieg der intrazellulären DMSP-Konzentration über 20 mmol L^{-1} am Tag 6 wurde der oben beschriebene rhythmische Tagesverlauf dieses DMSP-Parameters nicht mehr beobachtet. Die um 6 Uhr genommene Probe stellte nicht mehr das Tagesmaximum dar (Abb. 5.2 D). Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch den Anstieg der intrazellulären DMSP-Konzentration die notwendige Konzentration für eine Schutzfunktion permanent zur Verfügung steht. Tageszeitabhängige Schwankungen sind somit nicht mehr notwendig.

Für die N- Kulturen wurde für beide DMSP-Parameter zu keiner Zeit ein tageszeitabhängiger Verlauf beobachtet (Abb. 5.2 E bis G). Der mittlere DMSP-Gehalt pro Zelle war in der frühen exponentiellen Phase konstant (Tag 2 $0,185$, Tag 3 $0,182 \text{ pg pro Zelle}$; $p > 0,1$). Er stieg an, als das Medium an Nitrat verarmte. Der DMSP-Anstieg fand sowohl auf zellulärer als auch auf Volumenbasis statt. Aufgrund der deutlichen Zellvolumenabnahme am Tag 4 trat nahezu eine Verdopplung der intrazellulären DMSP-Konzentration auf. Der DMSP-Gehalt pro Zelle erhöhte sich hingegen um Faktor 1,4 (Mittelwert von Tag 2, 6 Uhr bis Tag 4, 14 Uhr im Vergleich zu Tag 4, 18 Uhr bis Tag 6, 14 Uhr). Beide Parameter erreichten am Tag 5 ein Plateau. Die DMSP-Werte blieben für den Rest der exponentiellen Phase und über die stationäre Phase hinweg konstant.

Eine statistische Auswertung der Datensätze lieferte keine Separierung der Wachstumsphasen wie es für die N+ Kulturen der Fall war. Ein Vergleich der mittleren intrazellulären DMSP-Konzentration zeigte, dass Werte der Tage 2 und 3 signifikant niedriger waren als die der folgenden Tage ($p < 0,05$).

Die N- Kultur wies zu Beginn der exponentiellen Phase keine signifikant höhere intrazelluläre DMSP-Konzentration als die N+ Kultur auf (Mittelwert der Tage 2 und 3 von N- im Vergleich zu Tag 3 bis 5 von N+, $p > 0,1$). Beide Behandlungen zeigten jedoch Unterschiede bei den Variationen im Tagesverlauf. Für die N- Kultur konnte lediglich am Tag 2 das Tagesmaximum um 6 Uhr beobachtet werden. Im Unterschied zu der N+ Kultur lag in der N- Kultur an den folgenden Tagen die intrazelluläre DMSP-Konzentration der um 6 Uhr genommenen Probe unterhalb der Werte der anschließenden Probennahmepunkte. Dies erscheint auf den ersten Blick als ein Widerspruch zu der oben diskutierten antioxidativen Schutzfunktion von DMSP. Demnach sollten Zellen zu Beginn der Lichtperiode die höchste intrazelluläre DMSP-Konzentration aufweisen. Eine genauere Betrachtung der Daten zeigt jedoch, dass um 6 Uhr mit Ausnahme von einem Datenpunkt die DMSP-Werte der N- Kultur oberhalb der intrazellulären DMSP-Konzentration der N+ Kultur liegen (ca. 20 mmol L^{-1} , Abb. 5.2 G). Die zu diesem

Zeitpunkt vorliegende Konzentration könnte somit bereits ausreichend für die Schutzfunktion gewesen sein.

Das Ausbleiben eines Musters im Tagesverlauf der N- Kultur kann auch mit der Entwicklung des Zellvolumens erklärt werden. Innerhalb der ersten 8 Stunden der Lichtperiode nahm das Zellvolumen der N- Kultur weniger stark zu als es bei der N+ Kultur beobachtet wurde (Abb. 5.1 C und I). Als Konsequenz ist der Verlauf der intrazellulären DMSP-Konzentration in der N- Kultur weniger ausgeprägt, da das Zellvolumen für die Berechnung dieses Parameters benötigt wird.

5.2.3 Einfluss der Stickstoff-Verarmung und Wachstumsphase auf die DMSP-Produktion der Zelle

Die anfängliche Nitrat-Konzentration beeinflusste nicht nur den Tagesverlauf des DMSP. Sie wirkte sich auch auf die Entwicklung des DMSP-Zellgehaltes und der intrazellulären DMSP-Konzentration über das gesamte Experiment hinweg aus.

In den N- Kulturen stiegen beide DMSP-Parameter während der exponentiellen Phase am Tag 4 innerhalb von 8 Stunden an und blieben für den Rest des Experimentes auf diesem Niveau (Abb. 5.2 E und F). Der Anstieg erfolgte unmittelbar nach der Nitrat-Verarmung des Mediums am Tag 4. Algen können als Reaktion auf osmotischen Stress innerhalb weniger Stunden ihren DMSP-Gehalt erhöhen oder absenken (KIRST 1989). In dieser Studie konnte nun gezeigt werden, dass Zellen auch aufgrund osmoseunabhängiger Faktoren wie Stickstoff-Verfügbarkeit ihren DMSP-Gehalt mit ähnlicher Geschwindigkeit verändern können. Ein derartiger Verlauf könnte eine Antwort auf eine Stresssituation sein, die am Tag 4 ausgeglichen werden musste.

Der Austausch von stickstoffhaltigen Osmolyten gegen DMSP wird oft im Zusammenhang mit erhöhten DMSP-Werten bei Nitrat-Limitierung diskutiert (ANDREAE 1986, TURNER *et al.* 1988). Der in dieser Studie verwendete *S. marinoi* Stamm produziert jedoch keine quantifizierbaren Mengen an GBT (siehe Tab. 4.2). Es ist somit unwahrscheinlich, dass allein der Ersatz dieser stickstoffhaltigen Verbindung für den deutlichen DMSP-Anstieg unter Stickstoff-limitierten Bedingungen verantwortlich ist. Geringe Gehalte stickstoffhaltiger Osmolyten wurden auch für andere Diatomeen wie *T. pseudonana* berichtet. Die Verbindungsklasse trug in dem Fall weniger als 1% zum Gesamtstickstoff der Zelle bei (KELLER *et al.* 1999b).

Eine Nährstofflimitierung kann zu einem erhöhten oxidativen Stress führen. Dies gilt insbesondere für Stickstoff, da die Synthese von Enzymen und in einigen Fällen auch von Co-Faktoren von der Stickstoff-Verfügbarkeit abhängig ist (ROY 2000, LITCHMAN *et al.* 2002). Auf Grundlage einzelner Beobachtungen wurde vorgeschlagen, dass erhöhte DMSP-Werte in

nährstofflimitierten Kulturen mit der antioxidativen Funktion von DMSP zusammenhängen könnten (SUNDA *et al.* 2002, BUCCIARELLI und SUNDA 2003, SUNDA *et al.* 2007). Der bei der Untersuchung von *S. marinoi* angewendete hohe Probennahme-Rhythmus erlaubt es, diese Hypothese zu unterstützen. Es lässt sich außerdem erkennen, dass derartige Anpassungsprozesse im Verlauf des Kulturwachstums innerhalb weniger Stunden stattfinden können.

Sowohl die N+ als auch die N- Kulturen zeigten positive DMSP-Produktionsraten während der Dunkelperiode (Abb. 5.3). Somit können nicht nur starke DMSP-Produzenten wie *Phaeocystis* sp. (STEFELS *et al.* 1996) und *E. huxleyi* (BUCCIARELLI *et al.* 2007) nachts DMSP produzieren, sondern auch Diatomeen.

Die N- Kulturen zeigten vor allem in der exponentiellen Phase hohe DMSP-Produktionsraten. Insbesondere während der Dunkelperiode übertrafen sie die Werte der N+ Kulturen ($p < 0,01$). Die hohen Produktionsraten weisen darauf hin, dass die N- Kulturen bereits in der frühen Wachstumsphase einen hohen Bedarf an DMSP hatten. Dies unterstützt die Theorie, dass DMSP als Antioxidans einem durch Stickstoff-Limitierung induzierten oxidativen Stress entgegenwirkt (SUNDA *et al.* 2007 und darin enthaltene Referenzen). Ein weiterer Hinweis hierauf sind die DMSP-Produktionsraten der N+ Kulturen. Im Unterschied zu den N- Kulturen produzierten sie während der Lichtperiode signifikant mehr DMSP als während der Dunkelperiode ($p < 0,001$ für exponentielle Phase). Der Bedarf an dem Antioxidans DMSP wurde hier in erster Linie von dem Lichtzyklus bestimmt (vgl. 5.2.2).

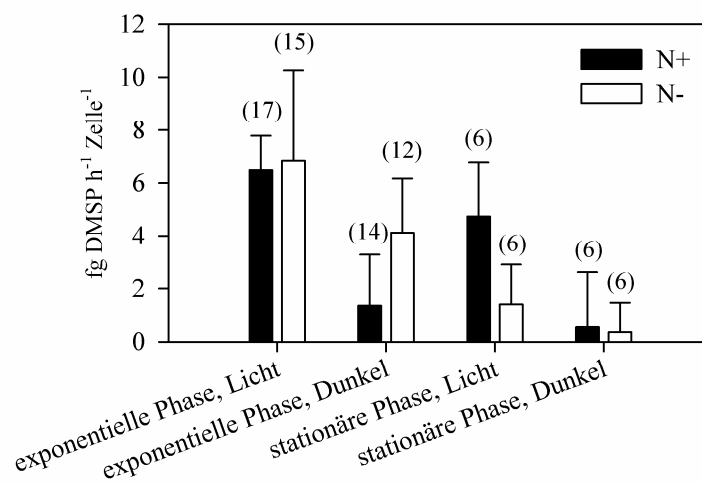


Abb. 5.3: DMSP-Produktionsraten für N+ (schwarze Balken) und N- Kulturen (weiße Balken); Lichtperiode 6 Uhr bis 18 Uhr, Dunkelperiode 22 Uhr bis 6 Uhr des nächsten Tages (für Details siehe 9.10.5); Fehlerbalken zeigen Standardabweichung, die Anzahl der Datenpunkte ist in Klammern angegeben.

Die N+ Kulturen zeigten nur an den ersten Tagen der stationären Phase eine signifikant höhere DMSP-Produktionsrate als die N- Kulturen (Lichtperiode, $p < 0,01$). Parallel dazu konnte in den

N+ Kulturen ein Anstieg des DMSP-Zellgehaltes und der intrazellulären DMSP-Konzentration über mehrere Tage hinweg beobachtet werden (Abb. 5.2 A und B). Dabei ist bemerkenswert, dass diese Zunahme vor einer Nitrat-Verarmung des Mediums stattfand (Abb. 5.2 A und B). Der Anstieg begann am Tag 6 um 22 Uhr, als noch $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ Nitrat und über $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ Nitrit im Kulturmedium vorlagen. Es kann somit angenommen werden, dass die Kulturen zu diesem Zeitpunkt nicht Nitrat-limitiert waren.

Die detaillierte Aufnahme in dieser Studie zeigt, dass der Anstieg des DMSP-Zellgehaltes und der intrazellulären DMSP-Konzentration nicht ausschließlich von der Stickstoff-Verfügbarkeit abhängt. Allgemein kann ein Austausch stickstoffhaltiger Osmolyten gegen DMSP bei Stickstoff-limitierten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Diese Hypothese erklärt jedoch nicht den in den N+ Kulturen beobachteten Anstieg vor einer Nitrat-Verarmung des Mediums. Nach STEFELS (2000) könnte die DMSP-Produktion als Entlastungsmechanismus eingesetzt werden, wenn ein Energieüberschuss zum Beispiel durch eine hohe Aktivität im Metabolismus vorliegt. Dies könnte den Anstieg der DMSP-Werte in der späten exponentiellen Phase erklären. Durch eine fortlaufende DMSP-Produktion kann die DMSP-Vorstufe Methionin auf einem geringen Niveau gehalten werden. Die Zelle würde damit möglichen Rückkopplungsmechanismen vorbeugen. Die Assimilation von Sulfat wäre weiterhin möglich. Ferner kann durch den Transaminierungsschritt bei der DMSP-Synthese Stickstoff für die Aminosäurebiosynthese gewonnen werden (vgl. Abb. 1.3) (STEFELS 2000).

Das Kulturmedium war bereits zu Beginn der exponentiellen Phase an Phosphat verarmt (im Verlauf von Tag 4, Abb. 5.1 E und K). Ein Einfluss dieses Nährstoffs auf DMSP ist damit unwahrscheinlich. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen von BUCCIARELLI und SUNDA (2003). Kulturen von *T. pseudonana* zeigten unter Phosphat-Limitierung den geringsten Anstieg an DMSP. Im Unterschied hierzu führte eine Limitierung an Silikat zu einer deutlicheren Erhöhung der DMSP-Werte. Ein Einfluss von Silikat ist auch für die N+ Kulturen denkbar. Die Zunahme der DMSP-Werte erfolgte zeitgleich mit der Silikat-Verarmung des Mediums (Abb. 5.1 D). Die DMSP-Entwicklung in den N+ Kulturen nach der Verarmung des Mediums an Silikat ist aber nicht mit dem schnellen Anstieg in den N- Kulturen nach Nitrat-Verarmung des Mediums vergleichbar. Silikat kann deswegen nur als ein Faktor von vielen angesehen werden, die die DMSP-Konzentration beeinflussen.

Die erhöhte DMSP-Produktion der N+ Kulturen in der stationären Phase führte dazu, dass das Maximum der partikulären DMSP-Konzentration (DMSP_p) vier Tage nach dem Erreichen der

maximalen Zellzahl beobachtet wurde (Abb. 5.4 A). Nach dem Eintritt in die stationäre Phase stieg die DMSPp-Konzentration um Faktor 2 an (Tag 7 bis Tag 11). In den N- Kulturen fand der Anstieg des DMSP-Zellgehaltes und der intrazellulären DMSP-Konzentration hingegen innerhalb weniger Stunden während der exponentiellen Phase statt. Bezogen auf DMSPp konnte im Zeitraum von Tag 6 bis Tag 12 nur ein Anstieg um Faktor 1,5 beobachtet werden und das Phänomen war nicht so stark ausgeprägt wie für die N+ Kulturen (Abb. 5.4 B).

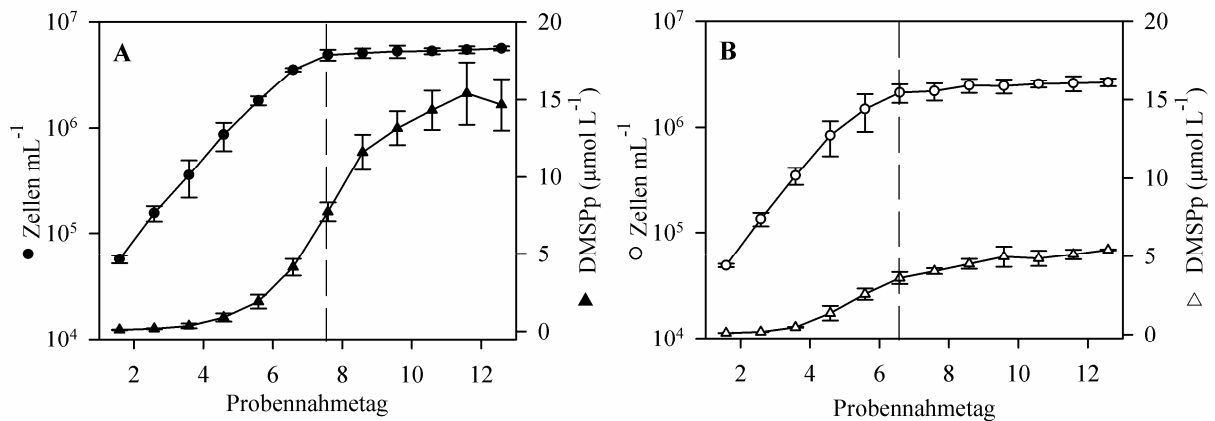


Abb. 5.4: Zellzahlen (Kreise) und DMSPp pro Liter Medium (Dreiecke) für (A) N+ und (B) N- Kulturen; gestrichelte Linie zeigt Übergang von exponentieller in die stationäre Wachstumsphase; Datenpunkte zeigen Proben um 14 Uhr; Zellzahlen sind mit logarithmischer Skala angegeben; Fehlerbalken zeigen Standardabweichung (n = 3).

In den N+ Kulturen stiegen der DMSP-Zellgehalt und die intrazelluläre DMSP-Konzentration im Kulturverlauf um fast 400% an (Vergleich frühe exponentielle Phase mit fortgeschrittener stationärer Phase). Beide Werte lagen am Ende über den DMSP-Werten der N- Kulturen. Dies ist von großer Bedeutung für die Untersuchung von Algenblüten in Feldstudien. Bisher wurden Schwankungen der dort beobachteten DMSP-Werte überwiegend mit der Präsenz oder dem Fehlen von bestimmten (starken) DMSP-Produzenten erklärt. Derartige Fluktuationen können aber auch auf veränderte DMSP-Produktionsraten zurückgehen, da diese offensichtlich mit dem physiologischen Zustand der jeweiligen Mikroalgen zusammenhängen.

In dieser Laborstudie wurde für die N+ Kulturen ein Zeitversatz von 4 Tagen zwischen dem Zellzahl- und dem DMSPp-Maximum festgestellt (Abb. 5.4 A). Eine derartige Verschiebung der beiden Datensätze wurde auch für eine *S. marinoi* Blüte im Rahmen einer Mesokosmos-Studie beobachtet (Abb. 5.5, Details zur Studie in 9.6.2). Die *S. marinoi* Kultur im Mesokosmos ging direkt aus der exponentiellen Phase in die Seneszenz-Phase über, die Maxima der Zellzahlen und DMSPp traten an zwei aufeinander folgenden Tagen auf. Demnach können physiologische Veränderungen, die die DMSP-Konzentration beeinflussen, auch unabhängig von dem Auftreten einer stationären Phase stattfinden. Eine Evaluation der Literaturdaten ergab, dass auch in

anderen Mesokosmos-Studien ein Zeitversatz zwischen Zellzahl und DMSPp gemessen wurde (WILSON *et al.* 1998, VOGT *et al.* 2008). Bislang wurden die Daten nicht unter dem oben aufgeführten Aspekt weiter diskutiert. Die aktuelle Studie zeigt jedoch deutlich, dass neben der Planktonstruktur auch die Physiologie der Zellen ein wichtiger Aspekt für die DMSP-Produktion darstellt und bei Interpretationen berücksichtigt werden sollte.

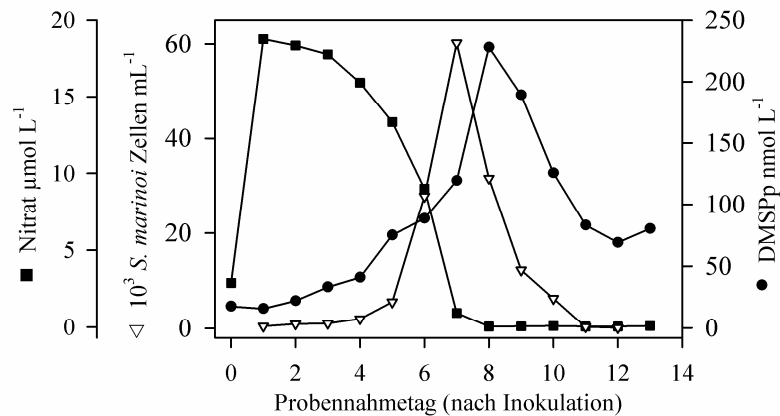


Abb. 5.5: Verlauf einer Algenblüte von *S. marinoi* (Dreiecke) im Rahmen einer Mesokosmos-Studie im Vergleich zu DMSPp (Kreise) und Nitrat (Quadrat) (für Details zur Studie siehe 9.6.2).

5.2.4 Weitere DMS-Vorstufen

In den meisten Studien wird die DMSP-Quantifizierung anhand indirekter Methoden über DMS vorgenommen. In diesem Experiment wurde DMSP nach der Derivatisierung mit PDAM analysiert. Um den Einfluss anderer DMS-Vorstufen zu ermitteln, wurde zusätzlich das indirekte Analysenverfahren (SPME-GC/MS) angewendet.

DMSP war in beiden Behandlungen die dominierende DMS-Vorstufe. Im Laufe der Kulturentwicklung gewannen jedoch andere DMS-Vorstufen an Bedeutung. Für N+ Kulturen wurde während der exponentiellen Phase zunächst kein Unterschied zwischen den beiden Analysenmethoden gefunden. Parallel zu ansteigenden DMSP-Zellgehalten wurden aber auch andere DMS-Vorstufen von der Zelle synthetisiert (Abb. 5.6 A). N- Kulturen produzierten ebenfalls weitere DMS-Vorstufen als das Medium an Nitrat verarmte (Abb. 5.6 B). Die Unterschiede zwischen den beiden Analysenmethoden betragen 5 bis 15% für die N-, 10 bis 15% für die N+ Kulturen. Im Fall der N+ Kulturen waren die Ergebnisse für die Tage 7 bis 12 signifikant verschieden (Tag 7 und 8 $p < 0,05$, Tag 9 $p < 0,01$, Tag 10 bis 12 $p < 0,001$). Für die N- Kulturen traten an den Tagen 5 bis 8 signifikante Unterschiede auf (Tag 6 $p < 0,05$, Tag 5, 7 und 8 $p < 0,01$).

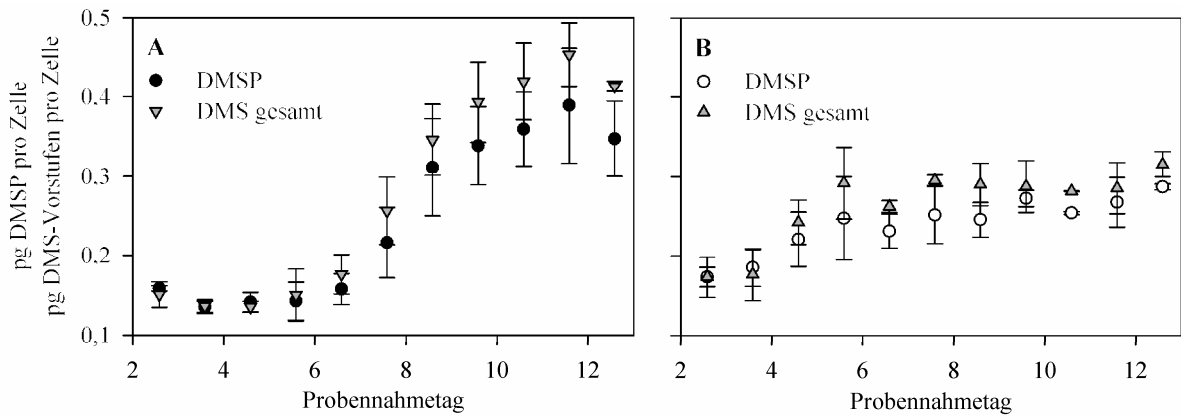


Abb. 5.6: Vergleich der direkten (Kreise) und indirekten (Dreiecke) DMSP-Bestimmung für (A) N+ und (B) N- Kulturen, Fehlerbalken zeigen Standardabweichung (n = 3).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung direkter Bestimmungsmethoden für DMSP. Der Einfluss einer Nährstofflimitierung könnte bei Anwendung indirekter Analysenmethoden überwertet werden. Erhöhte DMS-Freisetzungen nach Basenbehandlungen gehen nicht allein auf DMSP, sondern auch auf andere DMS-Vorstufen zurück.

Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass im Verlauf des Kulturwachstums metabolische und physiologische Veränderungen stattfinden, die das metabolische Profil der Kultur verändern. Derartige wachstumsphasenabhängige Veränderungen wurden bereits für *S. marinoi* und andere Diatomeen berichtet (BAROFSKY *et al.* 2009 und 2010).

Die Struktur der zusätzlichen DMS-Vorstufen ist bislang unbekannt. Es kann derzeit keine Aussage über ihre mögliche Funktion (Antioxidans, Osmolyt) getroffen werden. Außerdem liegen keine Informationen über einen möglichen enzymatischen Abbauweg vor, so dass auch keine Rückschlüsse über ihren Einfluss auf den globalen Schwefelkreislauf getroffen werden können.

6 DMSP-Aufnahme im Phytoplankton

6.1 Bisherige Studien

Die Konzentration des gelösten DMSP (DMSPd) liegt im Meerwasser in der Regel bei wenigen nmol pro Liter (für eine Übersicht siehe KIENE und SLEZAK 2006). Im Zusammenhang mit Algenblüten kann die Konzentration jedoch zeitweise über 100 nmol L⁻¹ betragen (MATRAI und KELLER 1993). Damit stellt DMSP, auch in Form seiner Abbauprodukte, eine potenziell wichtige Schwefelquelle für andere marine Organismen dar. Schwefel liegt in Form von Sulfat in bis zu 10⁷-fach höherer Konzentration im Meerwasser vor (GENG und BELAS 2010). Die Aufnahme und Reduktion von Sulfat ist aber mit einem hohen Energieaufwand verbunden (STEFELS 2000). Die Assimilation organischer Schwefelverbindungen birgt deswegen energetische Vorteile.

Bislang wurden Studien zur DMSP-Aufnahme anhand von extern appliziertem, radioaktiv markiertem ³⁵S-DMSP durchgeführt (KIENE *et al.* 1998, VILA-COSTA *et al.* 2006). Dabei konnte der Schwefel in verschiedenen Organismen wie Cyanobakterien, Diatomeen oder heterotrophen Bakterien detektiert werden. Die Verwendung von radioaktivem ³⁵S-DMSP hat den Vorteil einer sehr niedrigen NWG. Die Methode liefert aber nur Informationen über den Schwefel. Es können keine Aussagen getroffen werden, ob der Schwefel in Form von DMSP aufgenommen wird oder eine extrazelluläre Transformation stattfindet und ein anderer Schwefelmetabolit in die Zelle gelangt. Auch über den Verbleib von DMSP oder dem jeweiligen Abbauprodukt in der Zelle ist keine Aussage möglich.

KIENE *et al.* (1998) zeigten, dass die Aufnahme von DMSP durch GBT inhibiert wird und *vice versa*. DMSP scheint somit das gleiche Aufnahmesystem wie GBT zu nutzen. Über das GBT-Aufnahmesystem ist bekannt, dass zwitterionische Verbindungen um dieses System konkurrieren. Polare Verbindungen wie zum Beispiel Acrylsäure inhibieren die Aufnahme hingegen nicht (KIENE *et al.* 1998). Dies spricht für eine Aufnahme von DMSP als Zwitterion, so dass eine vorherige Transformation nicht notwendig wäre.

Um den Aufnahmemechanismus von DMSP genauer zu untersuchen, wurde doppeltmarkiertes DMSP synthetisiert (¹³C₂D₆-DMSP, *m/z* 143, Struktur siehe Abb. 6.3, Synthese durch Björn Gebser, GEBSER 2010) und Kulturen der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* zugesetzt. Dabei zeigte sich, dass diese Kultur DMSP unverändert aufnimmt (Detektion der Ionenspur 143, GEBSER 2010). In anschließenden Untersuchungen wurde anhand von weiteren Phytoplankton-Kulturen eine mögliche DMSP-Aufnahme getestet. Mit ausgewählten Stämmen wurde die Kinetik dieser Aufnahme untersucht (für Details siehe 9.11).

6.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Aufnahme von DMSP (Zusatz von 125 nmol L^{-1} pro Tag über fünf Tage hinweg) wurde nicht nur in den Diatomeen *T. pseudonana* und *Skeletonema costatum*, sondern auch in Kulturen von *Emiliana huxleyi* und dem Dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* beobachtet (Abb. 6.1). Dies ist bemerkenswert, da letztgenannte Arten durch eigene Produktion bereits hohe DMSP-Zellgehalte aufweisen (vgl. Tab. 4.1). Kulturen von *E. huxleyi* zeigten jedoch die geringste Aufnahme von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP im Verhältnis zu dem von der Zelle produziertem DMSP.

Eine andere Auffälligkeit bildet die Diatomee *T. weissflogii*. Diese Art produziert kein DMSP, aber hohe Mengen an GBT (Tab. 4.2). In dieser Kultur wurde die höchste Intensität des $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Signals beobachtet. Die Aufnahme von DMSP ist damit nicht an die Produktion von DMSP gebunden.

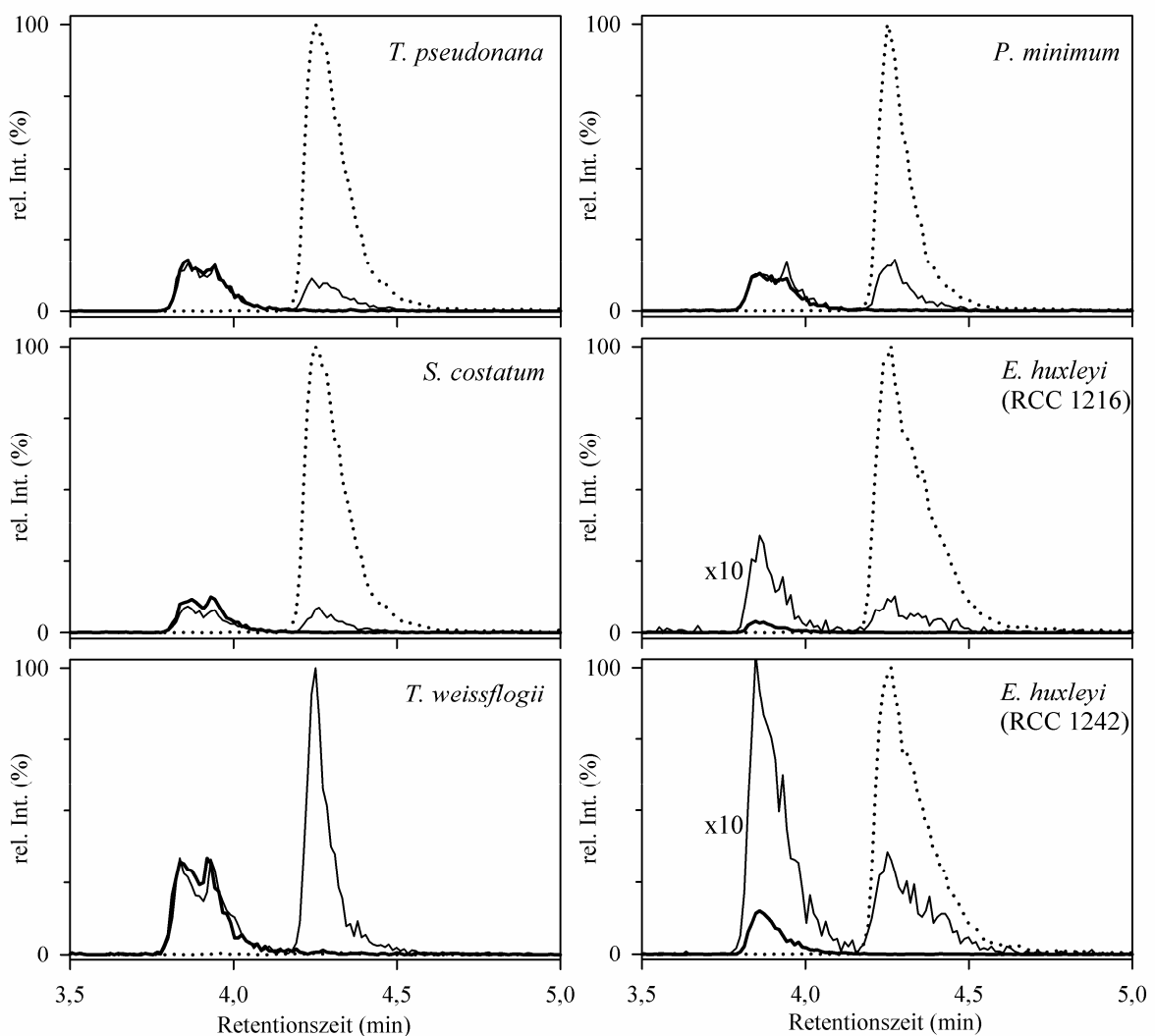


Abb. 6.1: Aufnahme von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP durch verschiedene Phytoplankton-Kulturen; gezeigt sind die Ionenspuren von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP (dünne Linie, m/z 143) und dem von der Kultur produzierten DMSP (gepunktete Linie, m/z 135); in den jeweiligen Kontrollkulturen konnte bei der Retentionszeit von DMSP kein Signal mit m/z 143 detektiert werden (dicke Linie).

Die Präsenz von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP in den Zellextrakten wurde durch eine MS/MS-Analyse bestätigt (Abb. 6.3 B). Parallel zu jeder Kultur mit $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Zusatz wurde eine Kultur ohne Zusatz kultiviert und analysiert (ZIC-HILIC-Methode). In den Kontrollkulturen konnte bei der Retentionszeit von DMSP (4,26 Minuten) kein Signal für m/z 143 detektiert werden. Das Signal bei 3,93 Minuten (Abb. 6.1) geht auf unbekannte Matrixbestandteile des Zellextraktes zurück.

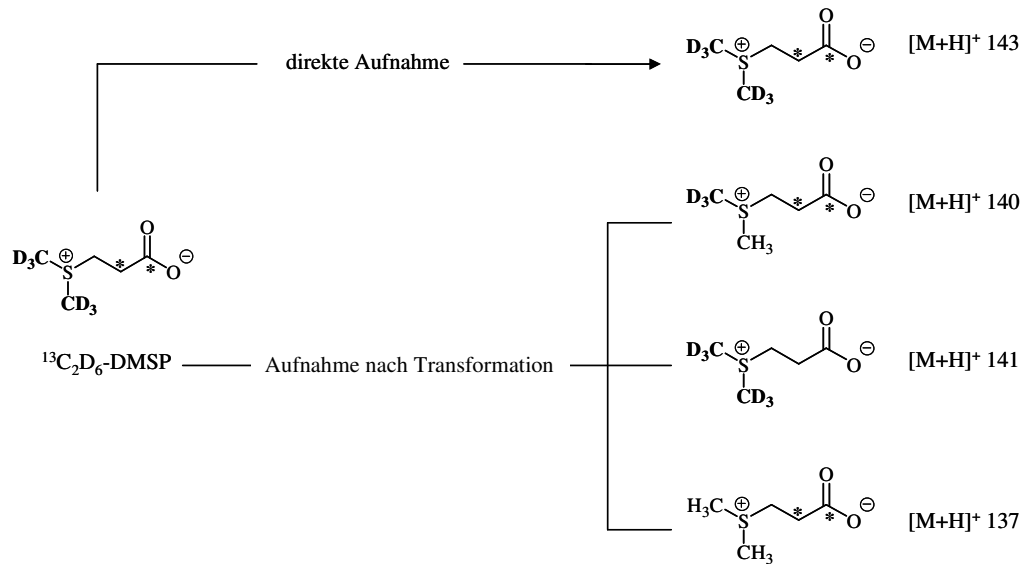


Abb. 6.2: Mögliche Aufnahmewege von $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP in die Zelle; * zeigt ^{13}C -Isotop.

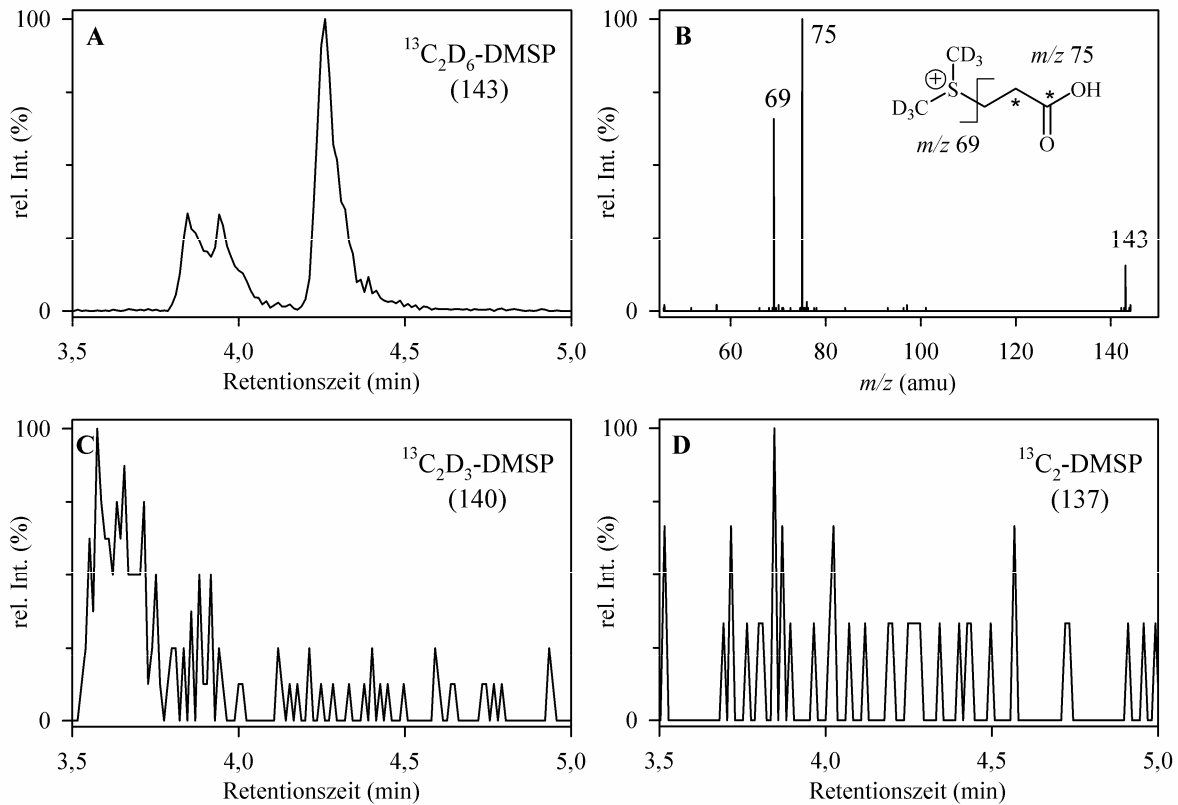


Abb. 6.3: Aufnahmemechanismus von DMSP (A) $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP im Zellextrakt von *T. weissflogii*, (B) dazugehöriges MS/MS; (C, D) Ionenspuren möglicher Transformationsprodukte zeigen, dass DMSP direkt von der Zelle aufgenommen wird.

Neben einer direkten Aufnahme des DMSP ohne vorherige Veränderung des Moleküls (m/z 143) wäre auch eine Transformation von DMSP und anschließende Aufnahme des Produktes denkbar. In der Zelle könnte aus diesem Produkt DMSP zurückgewonnen werden. Dabei würde aber bei Einbau natürlicher Vorstufen eine Veränderung der Molmasse auftreten (Abb. 6.2). Derartige Transformationsprodukte konnten aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 6.3 C und D). DMSP wird somit direkt und ohne vorherige Transformationen aufgenommen.

Nach KIENE *et al.* (1998) ist das Transportsystem von GBT und DMSP nicht spezifisch für diese beiden Substanzen, sondern selektiv für zwitterionische Verbindungen. Somit muss die Zelle keinen separaten Aufnahmemechanismus für DMSP entwickeln, wenn bereits andere Zwitterionen von der Zelle aufgenommen werden können. Dies kann die beobachtete DMSP-Aufnahme in *T. weissflogii* erklären. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung einer DMSP-Aufnahme bei Organismen, die weder GBT noch DMSP produzieren. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, wie weit Transportsysteme für Zwitterionen im Plankton verbreitet sind. Darüber hinaus könnte man Information erhalten, ob derartige Organismen DMSP überhaupt verwenden oder verwenden können.

Bei der Analyse der Aufnahme-Kinetik (Zusatz von einmalig 200 nmol L^{-1}) zeigte *E. huxleyi* schon nach 20 Minuten eine Sättigung des intrazellulären $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Gehaltes mit $0,08 \text{ fmol pro Zelle}$ (Abb. 6.4 A). Im Vergleich dazu lag der durchschnittliche DMSP-Gehalt pro Zelle mit $2,14 \text{ fmol}$ um ein Vielfaches höher. Sowohl der DMSP- als auch der GBT-Gehalt pro Zelle blieben über den Beobachtungszeitraum von 60 Minuten konstant (Abb. 6.4 B und C). Insgesamt wurden 30% des zugesetzten $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP aufgenommen.

Trotz der geringeren Zellzahl ($81,000 \text{ Zellen mL}^{-1}$ im Vergleich zu $793,000 \text{ Zellen mL}^{-1}$ bei *E. huxleyi*) konnten bei *T. weissflogii* bereits nach 2,5 Minuten 60% des zugesetzten $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 6.5 A). Im weiteren Verlauf wurde nur ein geringfügiger Anstieg beobachtet (70% nach 60 Minuten). Die Zellen wiesen am Ende einen $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Zellgehalt von $1,73 \text{ fmol}$ auf. Der GBT-Gehalt pro Zelle blieb unverändert.

Bemerkenswert ist, dass der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Gehalt in einer ähnlichen Größenordnung wie der DMSP-Gehalt in *E. huxleyi* liegt. Da *T. weissflogii* aber ein größeres Zellvolumen als *E. huxleyi* aufweist, wird bezogen auf die intrazelluläre $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Konzentration ein deutlicher Unterschied zwischen der Diatomee und der Kalkalge auftreten.

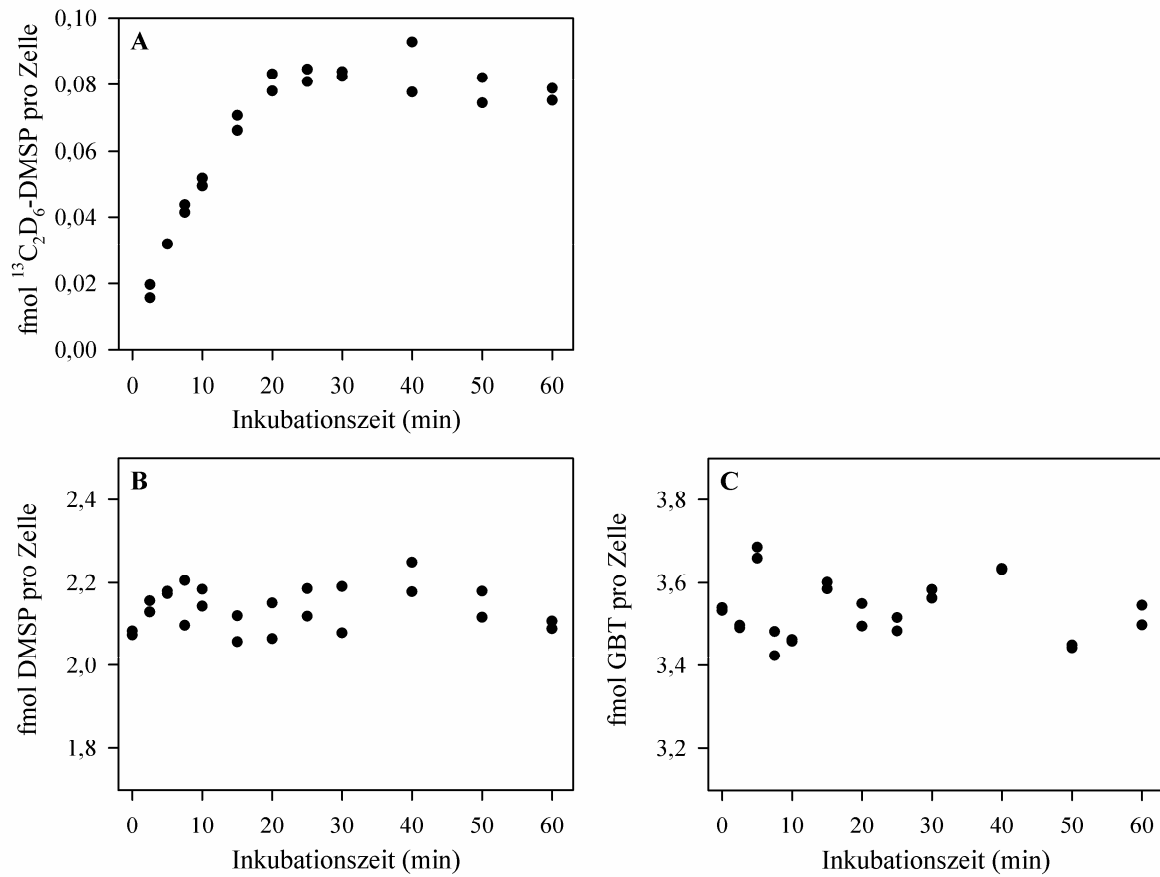


Abb. 6.4: Kinetik der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Aufnahme in *E. huxleyi*, zeitlicher Verlauf des intrazellulären (A) $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP, (B) DMSP und (C) GBT; Punkte zeigen Ergebnisse einer Zweifachmessung.

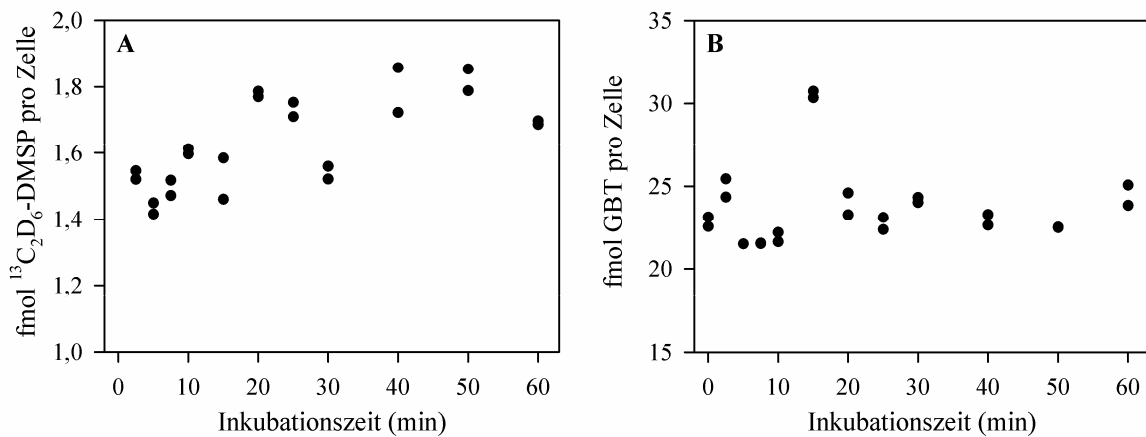


Abb. 6.5: Kinetik der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Aufnahme in *T. weissflogii*, zeitlicher Verlauf des intrazellulären (A) $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP, (B) GBT; Punkte zeigen Ergebnisse einer Zweifachmessung.

In beiden Kulturen wurden nach 20 Minuten keine weiteren Veränderungen des $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Gehaltes beobachtet. Dies ist relevant für die Berechnung der DMSP-Aufnahmerate. KIENE *et al.* (1998) ermittelten die Aufnahmerate von ^{35}S -DMSP anhand einer Inkubationszeit von 5 Minuten und extrapolierten das Ergebnis auf den Zeitraum von einer Stunde. Im Hinblick auf die hier gezeigten Resultate könnten die Aufnahmeraten zu hoch eingeschätzt sein, da DMSP über einen

Zeitraum von 60 Minuten nicht konstant bzw. permanent aufgenommen wird. Dabei muss aber beachtet werden, dass die oben dargestellte Studie mit einer $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Konzentration von 200 nmol L^{-1} durchgeführt wurde. Derartige Konzentrationen wurden im Zusammenhang mit Algenblüten starker DMSP-Produzenten beobachtet (MATRAI und KELLER 1993). KIENE *et al.* (1998) zeigten eine konzentrationsabhängige Aufnahme-Rate für ^{14}C -GBT. Für die ^{35}S -DMSP-Experimente wurden von den Autoren 20 nmol L^{-1} zu den Proben zugefügt. Die beobachtete Sättigung der $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Aufnahme nach 20 Minuten könnte somit auch eine Folge der vergleichsweise hohen $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Konzentration sein. In diesem Zusammenhang sollten weitere Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt werden, um ein besseres Verständnis über die Kinetik derartiger Aufnahmeprozesse zu erhalten.

Die vorgestellten Kinetik-Studien wurden mit Phytoplankton-Kulturen durchgeführt, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und nicht nährstofflimitiert waren. Weitere Aufnahme- und Kinetik-Studien sollten sich auch mit anderen Wachstumsphasen und Nährstoffsituationen beschäftigen. Eine Nährstofflimitierung kann gerade im Hinblick auf heterotrophe Organismen wie zum Beispiel Bakterien ein interessanter Aspekt sein. DMSP stellt für Bakterien eine wichtige Schwefel- und Kohlenstoffquelle dar und wird von ihnen schnell katabolisiert (DICKSCHAT *et al.* 2010).

7 Einfluss des Klimawandels

7.1 Einleitung

„In the light of new evidence and taking into account the remaining uncertainties, most of the observed warming over the last 50 years is likely to have been due to the increase in greenhouse gas concentrations.“ (HOUGHTON *et al.* 2001)

Im Zusammenhang mit dem sogenannten Klimawandel soll bis zum Jahr 2100 ein Anstieg der globalen Durchschnittstemperatur um 4,9 bis 6,1 °C stattfinden. Gleichzeitig soll der CO₂-Gehalt der Atmosphäre auf 660 bis 790 ppm ansteigen (PACHAURI und REISINGER 2007). Derartige Veränderungen haben auch Folgen für das aquatische Ökosystem, die zum Teil schon heute beobachtet werden können. Prognosen, wie sich Temperaturerhöhung und steigender CO₂-Gehalt zukünftig auf dieses Ökosystem auswirken, können bislang nur wage getroffen werden. Betrachtet man die wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die sich mit der Thematik des Klimawandels befassen, behandeln lediglich 5% das marine Ökosystem (HOEGH-GULDBERG und BRUNO 2010). Auch im Hinblick auf einen (kulturellen, wirtschaftlichen, Ressourcen bezogenen) Wert des marinen Ökosystems von 21 Billionen US\$ pro Jahr wird deutlich, dass der Forschungsbedarf auf diesem Gebiet sehr hoch ist (COSTANZA *et al.* 1997).

Im Zusammenhang mit einem steigenden CO₂-Gehalt in der Atmosphäre wird eine Versauerung der Ozeane erwartet. Nach heutigen Berechnungen wird bei einem Anstieg auf bis zu 790 ppm CO₂ von einem Absinken des pH-Wertes um bis zu 0,4 Einheiten von 8,2 auf 7,8 ausgegangen (RIEBESSELL 2004 und enthaltene Referenzen). Neben dem pH-Wert hat ein zunehmender CO₂-Eintrag in die Ozeane Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Carbonat und Hydrogencarbonat. Mit sinkenden pH-Werten nimmt die Carbonat-Konzentration im Ozean ab, was weitreichende Folgen für kalzifizierende Organismen hat. Aktuelle Prognosen gehen davon aus, dass bereits ab einem atmosphärischen CO₂-Gehalt von 450 ppm eine Untersättigung der Carbonat-Konzentration eintritt (MCNEIL und MATEAR 2008). Dies hätte zur Folge, dass es zu einer Auflösung von Calciumcarbonat kommt. Davon wären sowohl kalzifizierende Planktonorganismen wie zum Beispiel *Emiliania huxleyi* als auch wichtige Lebensräume wie die Korallenriffe betroffen (für weitere Beispiele zum Thema Auswirkungen des Klimawandels auf den Lebensraum marines Ökosystem siehe HOEGH-GULDBERG und BRUNO 2010).

Neben den Auswirkungen auf den Lebensraum an sich können bereits heute artenabhängige Veränderungen beobachtet werden. WINDER und SCHINDLER (2004) zeigten am Beispiel des

Lake Washington, dass im Verlauf der letzten Jahrzehnte aufgrund des weltweiten Temperaturanstieges Wechselwirkungen zwischen verschiedenen trophischen Ebenen entkoppelt wurden. Diatomeen bilden im Frühjahr einige Tage früher eine Algenblüte aus, wohingegen das Zooplankton in Form der Daphnien keinen derartigen Versatz zeigt. Jungen Daphnien fehlt somit die Nahrungsgrundlage für das Wachstum, was eine abnehmende Daphnien-Population in diesem Ökosystem zur Folge hat. Da Phyto- und Zooplankton am Anfang der aquatischen Nahrungsnetzwerke stehen, kann ein derartiges Ungleichgewicht weitreichende Folgen für Jäger-Beute-Wechselwirkungen in den jeweiligen Ökosystemen haben.

Wie bereits ausgeführt spielt nicht nur das Plankton selbst eine entscheidende Rolle im aquatischen Ökosystem, sondern auch dessen Stoffwechselprodukte. Ein besonderes Interesse gilt dabei DMSP. Es stellt nicht nur eine wichtige Schwefelquelle für andere Organismen dar (siehe 6.2), sondern besitzt als wichtige Vorstufe von DMS auch eine klimarelevante Wirkung. Es liegen bereits mehrere Studien vor, die sich mit dem Einfluss von höheren Temperaturen und/oder CO₂-Gehalt auf Artenzusammensetzung und Dynamiken im Phytoplankton beschäftigen (zum Beispiel TORTELL *et al.* 2002, HARE *et al.* 2007). In diesem Zusammenhang wird auch oft die Bildung von DMS untersucht (BOPP *et al.* 2003, WINGENTER *et al.* 2007, HOPKINS *et al.* 2010). Nur wenige Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss der Faktoren auf DMSP (VAN RIJSEL und GIESKES 2002, VOGT *et al.* 2008, LEE *et al.* 2009). LEE *et al.* (2009) zeigten dabei, dass bei partikulärem DMSP (DMSPp) synergetische Effekte von Temperatur und CO₂-Gehalt auftreten können. Während eine Behandlung mit erhöhtem CO₂-Gehalt in der Luft (690 ppm) keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle zeigte, führte eine Temperaturerhöhung um 4 °C zu einem signifikanten Anstieg des DMSPp. Die größte Zunahme des DMSPp wurde in der Behandlung mit erhöhter Temperatur und erhöhtem CO₂-Gehalt beobachtet. Diese Unterschiede wurden vor allem auf Veränderungen in der Artenzusammensetzung zurückgeführt.

Bislang wurden keine systematischen Untersuchungen von DMSP im Zusammenhang mit dem Klimawandel in verschiedenen unialgalen Phytoplankton-Kulturen durchgeführt. Die Studien von LEE *et al.* (2009) wurden während einer Algenblüte im Nordatlantik vorgenommen. VOGT *et al.* (2008) führten ihre Untersuchungen in Mesokosmen durch. Anhand derartiger Studien kann der Einfluss von CO₂ und steigender Temperaturen auf das komplexe System im marinen Plankton untersucht werden. Die Interpretation der Ergebnisse ist dabei aber nicht trivial. Durch einen Wechsel der äußeren Bedingungen können innerhalb des Netzwerkes mehrere Veränderungen parallel ablaufen (Artenzusammensetzung, physiologischer Zustand,

Metabolismus usw.). In diesem Zusammenhang kann es hilfreich sein Informationen über unialgale Kulturen zu erhalten. Anhand dieser Ergebnisse können Beobachtungen in Feldstudien (zumindest im Ansatz) erklärt werden (vergleiche hierzu auch Kapitel 5.2.3).

Ziel war es anhand unterschiedlicher Phytoplankton-Kulturen den Einfluss von Temperaturerhöhung, höheren CO₂-Gehalten und der Kombination beider Faktoren auf den DMSP-Gehalt zu ermitteln. Dabei wurden zwei weltweit vorkommende Diatomeen (*Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*) und zwei Stämme der Kalkalge *E. huxleyi* verwendet. Diese Auswahl deckt sowohl sogenannte schwache als auch starke DMSP-Produzenten ab. Darüber hinaus kann im Fall von *E. huxleyi* der Einfluss von höheren CO₂-Gehalten auf eine kalzifizierende Art untersucht werden. Die Besonderheit der beiden verwendeten *E. huxleyi* Stämme ist, dass sie das gleiche Genom, aber unterschiedliche Phänotypen aufweisen (ein kalzifizierender = Coccolithen-produzierender Stamm und ein nicht-kalzifizierender Stamm).

Zusätzlich zu DMSP wurde der zwitterionische Metabolit GBT analysiert. GBT gilt in der Natur als einer der weitverbreitetsten Osmolyten (YANCEY *et al.* 1982). Die Funktionen von GBT im Phytoplankton sind bislang jedoch kaum untersucht worden. GBT wird häufig im Zusammenhang mit DMSP und einer Nitrat-Limitierung diskutiert (vergleiche hierzu Kapitel 5). Die nachfolgende Studie stellt somit die erste systematische Untersuchung von GBT im Phytoplankton im Zusammenhang mit dem Einfluss von Temperatur und CO₂-Gehalt auf diesen Metaboliten dar.

7.2 Experimentelles Design

Im Vorfeld wurde das Versuchsdesign anhand der Diatomee *T. pseudonana* entwickelt. Dabei wurde untersucht, wie eine Anpassung der Kultur an die jeweiligen Kultivierungsbedingungen vorgenommen werden muss. In der Regel werden Kulturen in Labor- oder Mesokosmos-Studien einem sofortigen Temperaturwechsel oder einer erhöhten CO₂-Konzentration ausgesetzt (VAN RIJSSEL und GIESKES 2002, VOGT *et al.* 2008, LEE *et al.* 2009). Tatsächlich findet jedoch eine langsame Veränderung des Klimas im Laufe von 100 Jahren statt (siehe hierzu PACHAURI und REISINGER 2007). Aus diesem Grund wurde am Beispiel der Temperaturerhöhung als Alternative zu einem sofortigen Wechsel der Kultivierungsbedingungen (Erhöhung der Temperatur um 6 °C, (IV) in Abb. 7.1) eine schrittweise Heranführung der Kultur an die Endtemperatur getestet (Erhöhung in Abständen von 2 °C, (III) in Abb. 7.1). Dabei wurde untersucht, ob diese vergleichsweise langsame Akklimatisierung den DMSP- und GBT-Zellgehalt entscheidend beeinflusst (für Details zu dem Versuchsablauf siehe Abb. 9.2). Zwar stellt diese schrittweise

Heranführung immer noch einen rapiden Wechsel im Vergleich zu den Veränderungen über 100 Jahre hinweg dar. Dieses Versuchsdesign ermöglicht aber Rückschlüsse, ob ein sofortiger Wechsel der Kultivierungsbedingungen für die Untersuchung des Einflusses äußerer Faktoren angewendet werden kann.

Es zeigte sich, dass die langsame Akklimatisierung keinen Effekt auf den DMSP- und GBT-Gehalt der Zelle ausübte. Zwischen den beiden Behandlungen (schrittweise Heranführung an 20,5 °C beziehungsweise sofortige Temperaturerhöhung um 6 °C) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Wurde die Kultur von 20,5 °C auf 14,5 °C zurückgesetzt ((II) in Abb. 7.1), konnte kein signifikanter Unterschied zum DMSP- und GBT-Gehalt der Kontrolle ermittelt werden ((I) in Abb. 7.1).

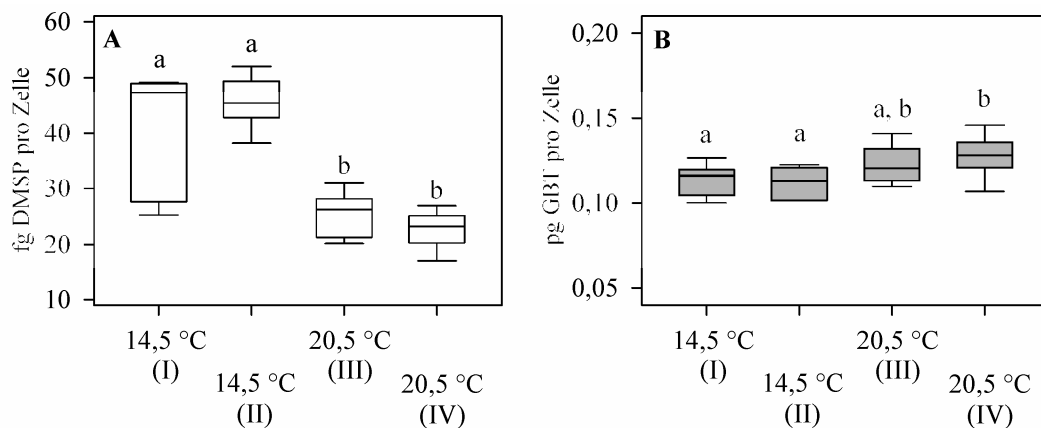


Abb. 7.1: Einfluss einer schrittweisen Temperatur-Gewöhnung von *T. pseudonana* auf DMSP- und GBT-Gehalt der Zelle; (I) Kontrolle, (II) Kultur wurde zunächst bei 20,5 °C gehalten und dann auf 14,5 °C gebracht, (III) Kultur wurde schrittweise auf 20,5 °C gebracht, (IV) Kultur wurde zunächst bei 14,5 °C gehalten und dann auf 20,5 °C gebracht; unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); ANOVA on Ranks (DMSP) bzw. One Way ANOVA (GBT) mit Tukey Post Hoc Test; für Details zu dem Versuchsablauf siehe Abb. 9.2.

Die nachfolgenden Experimente wurden daraufhin ohne schrittweise Heranführung an die Untersuchungsparameter (Temperatur, CO₂-Gehalt) durchgeführt. Es wurde lediglich eine Akklimatisierung bei den jeweiligen Wachstumsbedingungen vorgenommen (Details siehe 9.12).

7.3 Ergebnisse und Diskussion

Im Nachfolgenden werden folgende Bezeichnungen für die jeweiligen Behandlungen verwendet: T+ für Kultivierung bei 20,5 °C und Belüftung mit Aquariumpumpe, TC+ für Kultivierung bei 20,5 °C und Belüftung mit synthetischer Luft mit 790 ppm CO₂, C+ für Kultivierung bei 14,5 °C und Belüftung mit synthetischer Luft mit 790 ppm CO₂. Die T+ und TC+ Behandlungen sowie die C+ Behandlung wurden jeweils mit einer Kontrolle (K1 bzw. K2) verglichen. Jede

Behandlung bzw. Kontrolle wurde in Triplikaten angesetzt. Die Probennahme erfolgte, wenn mindestens sieben Generationen der untersuchten Art den jeweiligen Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren (für weitere Details zur Versuchsdurchführung siehe 9.12).

Für alle Kulturen wurden zunächst die T+ und TC+ Behandlungen durchgeführt. Parallel wurde die Kontrolle K1 kultiviert. Nach erfolgter Probennahme wurden die K1 Kulturen in sechs Aliquote aufgeteilt und verdünnt. Drei dienten im weiteren Verlauf als Kontrolle K2, drei wurden für die C+ Behandlungen verwendet. Eine gleichzeitige Durchführung der T+, TC+ und C+ Behandlungen war aus logistischen Gründen nicht möglich.

Für die Kulturen von K1 und K2 traten deutliche Unterschiede bei dem DMSP- und GBT-Zellgehalt auf. Die Ursache für diese Unterschiede ist unbekannt. Die Kontrollkulturen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert, so dass keine Differenzen bezüglich der Lichtintensität oder Nährstoffsituation auftreten konnten. Veränderungen in der Zellzusammensetzung wurden im Rahmen von halbkontinuierlichen Kulturen vor allem bei limitierenden Faktoren (Nährstoffe, Licht) über einen längeren Zeitraum beobachtet (DE MADARIAGA und JOINT 1992, SUNDA *et al.* 2007). Derartige Limitierungen traten bei diesem Experiment aber nicht auf. Die Auswertung der DMSP- und GBT-Werte in K1, T+ und TC+ wurden aufgrund dieser beobachteten Unterschiede statistisch separat von K2 und C+ durchgeführt.

7.3.1 Allgemeine Parameter

Eine Erhöhung der Temperatur (T+ und TC+) hatte für alle untersuchten Arten einen signifikanten Anstieg der Zellteilungsrate zur Folge (Tab. 7.1). Eine erhöhte CO₂-Konzentration zeigte keinen signifikanten Effekt. Höhere Zellteilungsraten bei höherer Temperatur ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei verschiedenen Planktonkulturen (EPPLEY 1972, MONTAGNES und FRANKLIN 2001, BERGES *et al.* 2002, VAN RIJSSEL und GIESKES 2002). Den größten Einfluss zeigte die Temperaturerhöhung bei *Emiliana huxleyi* mit einer Wachstumssteigerung von Faktor 2 bis 3. Die Diatomeen zeigten einen vergleichsweise geringen Anstieg (Tab. 7.1).

Zellteilungsraten von beispielsweise 0,69 und 1,39 d⁻¹ entsprechen einer Verdopplung bzw. einer Vervierfachung der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden. Die Diatomeen zeigten bereits unter Kontrollbedingungen mehr als eine Verdopplung pro Tag. Eine deutliche Wachstumssteigerung bei einer höheren Kultivierungstemperatur war somit nicht zu erwarten. Im Gegensatz hierzu zeigten *E. huxleyi* geringe Zellteilungsraten bei den Kontrollbedingungen. Die Kultivierungstemperatur von 14,5 °C liegt unterhalb der für die Stämme empfohlenen

Temperatur von 17 °C (Empfehlung der Roscoff Kultursammlung). Eine Temperaturerhöhung kann in diesem Fall das Wachstum deutlich begünstigen.

Tab. 7.1: Absolute und relative Zellteilungsrate (d^{-1})

Kultur	K1	T+	TC+	K2	C+
<i>Thalassiosira</i>	1,07±0,16	1,36±0,23	1,43±0,21	1,19±0,15	1,17±0,19
<i>pseudonana</i>	(1,00) ^a	(1,26) ^b	(1,33) ^b	(1,00) ^a	(0,98) ^a
<i>Phaeodactylum</i>	0,84±0,12	0,97±0,12	1,03±0,10	0,83±0,11	0,81±0,12
<i>tricornutum</i>	(1,00) ^a	(1,16) ^b	(1,23) ^b	(1,00) ^a	(0,97) ^a
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,21±0,17	0,49±0,20	0,56±0,22	0,32±0,15	0,31±0,15
(nicht kalz.)	(1,00) ^a	(2,33) ^b	(2,68) ^b	(1,00) ^a	(0,97) ^a
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,20±0,20	0,54±0,22	0,67±0,22	0,30±0,15	0,36±0,14
(kalz.)	(1,00) ^a	(2,66) ^b	(3,32) ^b	(1,00) ^a	(1,15) ^a

Werte in Klammern geben relative Zellteilungsrate bezogen auf die Kontrolle an; unterschiedliche Exponenten innerhalb einer Zeile zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); One Way ANOVA mit Tukey Post-Hoc Test (*T. pseudonana*, *P. tricornutum*) bzw. ANOVA on Ranks mit Dunn Post-Hoc Test (*E. huxleyi*)

CO₂ stellt unter den Kontrollbedingungen keinen wachstumslimitierenden Faktor dar (BURKHARDT *et al.* 1999, WOLF-GLADROW *et al.* 1999). Diatomeen befinden sich bereits unter heutigen CO₂-Verhältnissen im Sättigungsbereich ihrer Photosyntheserate (BURKHARDT *et al.* 2001, ROST *et al.* 2003). Eine erhöhte CO₂-Konzentration führte deswegen zu keiner signifikanten Erhöhung der Zellteilungsrate, wirkte aber auch nicht limitierend.

Ein deutlicher Anstieg der Zellteilungsrate wurde für die TC+ Behandlung der kalzifizierenden *E. huxleyi* beobachtet. Der Unterschied zur T+ Behandlung war jedoch nicht signifikant. Für kalzifizierende Kulturen von *E. huxleyi* werden sowohl niedrigere (NIMER *et al.* 1994) als auch höhere Zellteilungsrate bei erhöhten CO₂-Gehalten berichtet (FENG *et al.* 2008). NIMER *et al.* (1994) ermittelten die Zellteilungsrate anhand einer batch-Kultur, während FENG *et al.* (2008) die Kultur täglich verdünnten, bis über mehrere Generationen (> 7) hinweg eine konstante Zellteilungsrate beobachtet wurde. Dies lässt auf eine Gewöhnung an die neuen Wachstumsbedingungen schließen. Zu Beginn der Kultivierung wiesen die Kulturen der T+ Behandlung eine höhere Zellteilungsrate als die Kulturen der TC+ Behandlung auf (0,60 im Vergleich zu 0,41). Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von NIMER *et al.* (1994). Im weiteren Verlauf des Experiments überstieg die Zellteilungsrate in der TC+ Behandlung jedoch die in der T+ Behandlung (siehe Tab. 7.1), was zu einem mit FENG *et al.* (2008) vergleichbaren

Ergebnis führte. Vor diesem Hintergrund sollten Vergleiche mit bisherigen Studien immer auch im Hinblick auf eventuelle Akklimatisierungsphasen vorgenommen werden.

Eine Erhöhung der Temperatur führte zu einer zum Teil signifikanten Abnahme des Zellvolumens (Tab. 7.2). Für die Diatomee *T. pseudonana* konnte aufgrund der geringen Zellgröße kein Zellvolumen ermittelt werden. Eigenen Beobachtungen nach nahm auch hier das Zellvolumen mit höherer Temperatur ab. Eine Volumenabnahme bei Temperaturerhöhung wurde bereits bei verschiedenen Planktonkulturen beobachtet (MONTAGNES und FRANKLIN 2001, VAN RIJSSEL und GIESKES 2002).

Tab. 7.2: Zellvolumen (μm^3)

Kultur	K1	T+	TC+	K2	C+
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	122,8±32,3 ^a	101,9±22,5 ^b	104,7±24,0 ^b	132,3±27,1 ^a	140,2±24,2 ^a
<i>Emiliana huxleyi</i> (nicht kalz.)	54,7±12,7 ^a	46,7±12,0 ^{a,b}	42,6±9,8 ^b	50,8±11,7 ^a	42,3±11,9 ^b
<i>Emiliana huxleyi</i> (kalz.)	115,1±36,3 ^a	86,9±32,6 ^b	95,3±33,2 ^{a,b}	106,2±26,5 ^{a,b}	113,4±25,3 ^a

unterschiedliche Exponenten innerhalb einer Zeile zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); One Way ANOVA mit Tukey Post-Hoc Test (*P. tricornutum*) bzw. ANOVA on Ranks mit Dunn Post-Hoc Test (*E. huxleyi*)

Es werden mehrere Gründe für ein kleineres Zellvolumen bei höherer Temperatur diskutiert. Die Bewegung des Planktons hängt allein von der umgebenden Wasserströmung ab. Die Dichte und die Viskosität von Wasser nehmen mit steigender Temperatur ab, der Auftrieb verringert sich. Die Folge ist eine schnellere Sedimentation. Zellen können durch Verkleinerung der Zellgröße diesem Trend entgegenwirken (ATKINSON 1994).

Eine Temperaturerhöhung führt auch zu einer erhöhten Zellteilungsrate, diese begünstigt wiederum kleinere Zellvolumina (ATKINSON *et al.* 2003, LITCHMAN *et al.* 2009). Darüber hinaus liegt bei höheren Zellteilungsraten ein höherer Nährstoffbedarf vor. Die Nährstoffaufnahme stellt in solchen Fällen oft den limitierenden Schritt dar. Durch eine Verringerung des Zellvolumens wird das Oberflächen:Volumen-Verhältnis erhöht, so dass eine effektive Nährstoffaufnahme erfolgen kann (ATKINSON *et al.* 2003, LITCHMAN *et al.* 2009). Dies gilt vor allem für nährstofflimitierte Kulturen. Da die Kulturen in der hier gezeigten Studie durch regelmäßige Verdünnungen in der exponentiellen Phase gehalten wurden, trat keine Limitierung von Phosphat oder Nitrat auf. Durch eine Temperaturerhöhung nimmt die Löslichkeit von Gasen in

Wasser ab. CO₂ kann damit zu einem wachstumslimitierenden Faktor werden. Durch eine Verringerung der Zellgröße kann die Zelle diese Limitierung aufheben bzw. reduzieren (ATKINSON *et al.* 2003).

Die Kulturen der T+ und TC+ Behandlungen von *T. pseudonana* zeigten im Vergleich zu der Kontrolle einen signifikanten Anstieg der *in vivo* Fluoreszenz (Tab. 7.3). Eine Temperaturabhängigkeit des Chlorophyll a (Chl a) Gehaltes in Diatomeen wurde bereits beschrieben (LI und MORRIS 1982, BERGES *et al.* 2002, STRAMSKI *et al.* 2002). Durch Anhebung des Chl a Zellgehaltes kann eine Kultur ihre Zellteilungsrate als Reaktion auf eine Temperaturerhöhung steigern (EL-SABAAWI und HARRISON 2006). Für *P. tricornutum* wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Behandlungen festgestellt. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von GOLDMAN und MANN (1980), die im Bereich von 15 bis 22 °C nahezu konstante Chl a Zellgehalte für *P. tricornutum* fanden. Auch von anderen Autoren wird *P. tricornutum* als Sonderfall bei der Temperaturabhängigkeit des Chl a Zellgehaltes diskutiert (ANNING *et al.* 2001 und enthaltene Referenzen). Die kalkifizierende *E. huxleyi* wies unter C+ Bedingungen eine signifikant höhere *in vivo* Fluoreszenz pro Zelle als die anderen Kulturen auf. Vergleichbare Ergebnisse wurden von DE BODT *et al.* (2010) berichtet. Offensichtlich wird die Synthese von Chl a in der Kalkalge *E. huxleyi* anders reguliert als in der Diatomee *T. pseudonana*.

Tab. 7.3: *In vivo* Fluoreszenz in Bezug auf Zellzahl (10³)

Kultur	K1	T+	TC+	K2	C+
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2,34±0,50 ^{a,b}	3,27±0,42 ^c	3,36±0,44 ^c	2,07±0,22 ^a	2,71±0,39 ^b
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2,94±0,26 ^a	2,89±0,27 ^a	2,85±0,31 ^a	2,82±0,28 ^a	2,97±0,30 ^a
<i>Emiliana huxleyi</i> (nicht kalz.)	2,61±0,27 ^{a,b}	2,57±0,29 ^{a,b}	2,59±0,34 ^{a,b}	2,47±0,35 ^a	2,67±0,33 ^b
<i>Emiliana huxleyi</i> (kalz.)	3,28±0,27 ^a	2,98±0,40 ^b	3,30±0,37 ^a	3,14±0,35 ^{a,b}	3,53±0,36 ^c

unterschiedliche Exponenten innerhalb einer Zeile zeigen einen signifikanten Unterschied (p < 0,05); ANOVA on Ranks mit Dunn Post-Hoc Test

Die Kulturen der C+ und TC+ Behandlungen zeigten erwartungsgemäß signifikant niedrigere pH-Werte als die jeweilige Kontrollen und die T+ Behandlungen (Tab. 7.4). Bei den Diatomeen

wurde kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der T+ Behandlung beobachtet. Die T+ Behandlungen von *E. huxleyi* wiesen einen signifikant höheren pH-Wert als die Kontrolle auf.

Tab. 7.4: pH-Wert des jeweiligen Kulturmediums

Kultur	K1	T+	TC+	K2	C+
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	8,29 ^a	8,28 ^a	8,21 ^b	8,28 ^a	8,16 ^b
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8,19 ^a	8,23 ^a	8,07 ^b	8,44 ^a	8,19 ^b
<i>Emiliana huxleyi</i> (nicht kalz.)	8,23 ^a	8,40 ^b	8,15 ^c	8,51 ^a	8,12 ^b
<i>Emiliana huxleyi</i> (kalz.)	8,28 ^a	8,54 ^b	8,17 ^c	8,28 ^a	8,06 ^b

K1, T+, TC+ One Way ANOVA bzw. ANOVA on Ranks (*P. tricornutum*) mit Tukey Post-Hoc Test, K2 und C+ t-Test; unterschiedliche Exponenten innerhalb einer Zeile und Gruppe zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$)

Phytoplankton-Kulturen nehmen für die Photosynthese gelösten anorganischen Kohlenstoff (DIC) aus dem Medium auf. Dies führt vor allem bei dichten Kulturen zu einer Erhöhung des pH-Wertes durch die Bildung von CO₂ und Hydroxid-Ionen aus Hydrogencarbonat (LUNDHOLM *et al.* 2004 und enthaltene Referenzen, Engel *et al.* 2005). Die T+ Behandlungen der *E. huxleyi* Kulturen wiesen eine signifikant höhere Zellteilungsrate und damit auch eine höhere Zelldichte und Photosyntheserate als die Kontrollkulturen auf. Folglich konnte die DIC-Konzentration in den T+ Behandlungen stärker abgesenkt werden, so dass im Vergleich zu den Kontrollkulturen eine pH-Wert Erhöhung eintreten konnte. Die oben genannten Faktoren trafen auch für die TC+ Behandlungen zu. Hier wurde aber durch die permanente Zufuhr von CO₂-reicher Luft der DIC im Medium auf einem hohen Niveau gehalten. Durch die vermehrte Bildung von Kohlensäure und deren Dissoziation kam es zu einer pH-Wert Erniedrigung. Ohne eine ständige Zufuhr wäre auch hier ein Anstieg des pH-Wertes wahrscheinlich gewesen, wie es bereits in Mesokosmos-Studien beobachtet wurde (ENGEL *et al.* 2005).

7.3.2 Vorbetrachtungen

Die Analyse der DMSP- und GBT-Konzentrationen ergab sehr komplexe Zusammenhänge zwischen den beiden Metaboliten und den äußeren Faktoren Temperatur und CO₂-Gehalt der Luft. Während für die Entwicklung des GBT in den untersuchten Arten ein relativ einheitliches Bild beobachtet werden konnte (Tab. 7.5), traten im Fall von DMSP zum Teil sehr gegensätzliche Reaktionen auf (Tab. 7.6). Im Nachfolgenden wird im Detail versucht, die Ergebnisse mit bisherigen Resultaten aus der Literatur zu erklären. Inwieweit diese

Interpretationen im physiologischen Kontext Bestand haben, kann im Hinblick auf die wenigen Studien zum Thema Klimawandel und DMSP-/GBT-Entwicklung nicht abgeschätzt werden.

Tab. 7.5: Allgemeine Trends für die Entwicklung von GBT in den jeweiligen Behandlungen

Kultur	C+	T+	TC+		C+	T+	TC+
	GBT-Zellgehalt				intrazelluläre GBT-Konz.		
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	→	↑	↑		n.b.	n.b.	n.b.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	↓	↑	↑		↓	↑	↑
<i>Emiliana huxleyi</i> (nicht kalz.)	↓	↑	↑		↓	↑	↑
<i>Emiliana huxleyi</i> (kalz.)	↓	→	↑		↓	↗	↑

Tab. 7.6: Allgemeine Trends für die Entwicklung von DMSP in den jeweiligen Behandlungen

Kultur	C+	T+	TC+		C+	T+	TC+
	DMSP-Zellgehalt				intrazelluläre DMSP-Konz.		
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	↓	↓	↓		n.b.	n.b.	n.b.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	↘	↓	↓		↓	↘	↓
<i>Emiliana huxleyi</i> (nicht kalz.)	↑	→	↑		↑	↑	↑
<i>Emiliana huxleyi</i> (kalz.)	→	↓	↗		↘	→	↑

↓, ↑ signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; ↘, ↗ kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, aber Tendenz erkennbar; → kein signifikanter Unterschied; n.b. – nicht bestimmt

7.3.3 GBT

Beide Diatomeen-Arten und der nicht kalzifizierende Stamm von *E. huxleyi* zeigten einen signifikanten Anstieg des GBT-Zellgehaltes und der intrazellulären GBT-Konzentration für die T+ und TC+ Behandlungen (Abb. 7.2 bis Abb. 7.4 A und C).

Die Zunahme der GBT-Werte kann im Fall der Diatomeen keine Folge abnehmender DMSP-Werte sein (vergleiche hierzu 7.3.4). Im Fall von *P. tricornutum* steigt die intrazelluläre GBT-

Konzentration von 7 auf über 25 mmol L⁻¹, während die intrazelluläre DMSP-Konzentration lediglich von 1,7 auf 1 mmol L⁻¹ absinkt (vgl. Abb. 7.3 C und Abb. 7.7 C). Bei der nicht-kalzifizierenden Kultur von *E. huxleyi* steigt sowohl die DMSP- als auch die GBT-Konzentration an (vgl. Abb. 7.4 C und Abb. 7.8 C). Dies bestätigt die Aussage von Keller *et al.* (1999b), dass DMSP und GBT nicht reziprok zusammenhängen. Der Anstieg der GBT-Werte muss auf eine physiologische Funktion zurückgehen, die über eine Osmoregulation hinausgeht.

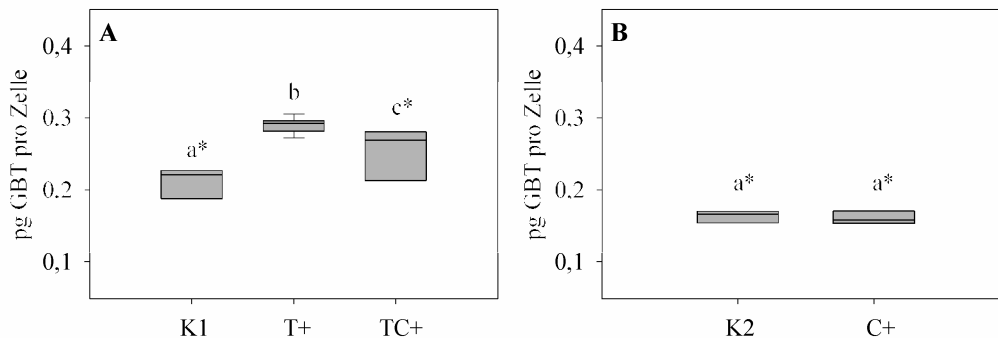


Abb. 7.2: GBT-Gehalt pro Zelle in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *T. pseudonana*; * ein Ausreißer wurde aus dem Datensatz entfernt (n = 8, siehe 9.12.8); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied (p < 0,05); (A) One Way ANOVA mit Tukey Post Hoc Test, (B) t-Test.

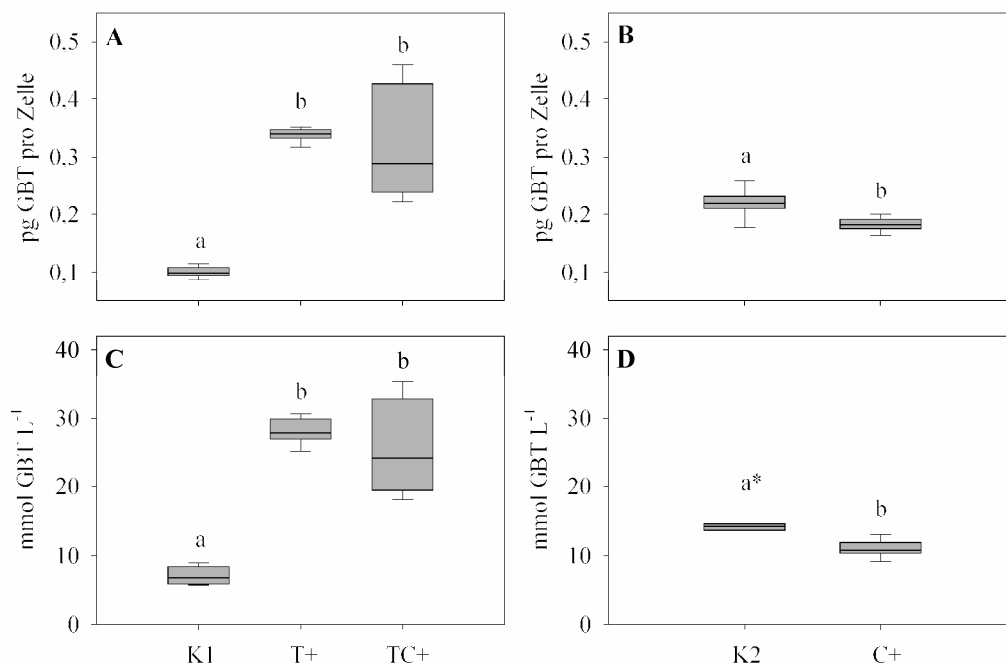


Abb. 7.3: (A, B) GBT-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *P. tricornutum*; * ein Ausreißer wurde aus dem Datensatz entfernt (n = 8, siehe 9.12.8); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied (p < 0,05); (A und C) ANOVA on Ranks mit Tukey Post Hoc Test, (B und D) t-Test.

Untersuchungen an höheren Pflanzen haben gezeigt, dass GBT bei hohen Temperaturen Membranen und Proteine stabilisieren kann (JOLIVET *et al.* 1982, PAPAGEORGIU und MURATA 1995). Derartige Effekte traten bei 35 °C bereits ab einer Konzentration von 25 mmol L⁻¹ auf

(*Beta vulgaris*, JOLIVET *et al.* 1982). Die intrazelluläre GBT-Konzentration in den hier untersuchten Phytoplankton-Kulturen lag in den T+ und TC+ Behandlungen über dem beschriebenen Wert von 25 mmol L^{-1} . Erhöhte GBT-Werte bei steigender Temperatur könnten somit eine Reaktion auf Temperaturstress sein.

Im Vergleich zu *P. tricornutum* zeigte *T. pseudonana* nur einen geringen Anstieg des GBT-Zellgehaltes in den T+ und TC+ Behandlungen (0,21 im Vergleich zu 0,29 bzw. 0,25 pg GBT pro Zelle). Aufgrund der geringeren Zellgröße besitzt *T. pseudonana* bei gleichem GBT-Zellgehalt eine höhere intrazelluläre GBT-Konzentration als *P. tricornutum*. Die für eine Schutzfunktion notwendige intrazelluläre GBT-Konzentration kann schon durch geringfügig erhöhte Zellgehalte in den T+ und TC+ Behandlungen erreicht werden.

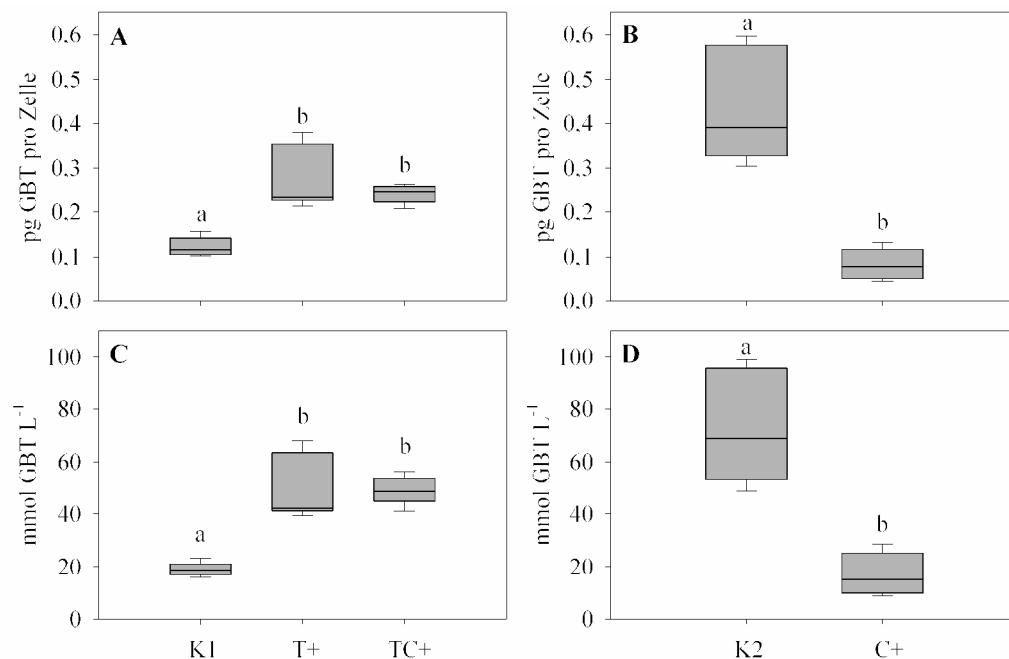


Abb. 7.4: (A, B) GBT-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *E. huxleyi* (nicht-kalzifizierend); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A und C) One Way ANOVA mit Tukey Post Hoc Test, (B und D) Mann-Whitney-Test.

Die nicht-kalzifizierende *E. huxleyi* wies von allen untersuchten Kulturen die höchste intrazelluläre GBT-Konzentration für die T+ und TC+ Behandlungen auf (50 mmol L^{-1} im Vergleich zu 25 bis 30 mmol L^{-1} bei den anderen drei Arten). Die TC+ Behandlung zeigte daneben die höchste intrazelluläre DMSP-Konzentration (120 mmol L^{-1} , Abb. 7.8 C). Diese Tatsache hebt nochmals hervor, dass sowohl DMSP als auch GBT neben einer Osmoregulation weitere physiologische Funktionen einnehmen und nicht lediglich gegeneinander ausgetauscht werden. Im Unterschied zu GBT kann DMSP bei höheren Konzentrationen ($\geq 100 \text{ mmol L}^{-1}$) eine destabilisierende Wirkung auf Proteine ausüben (NISHIGUCHI und SOMERO 1992). Aus

diesem Grund muss trotz und möglicherweise auch wegen einer hohen DMSP-Konzentration die Synthese von GBT erfolgen, um dem Temperaturstress entgegenzuwirken.

Die T+ und TC+ Behandlungen der kalzifizierenden *E. huxleyi* zeigten im Vergleich zu den anderen Arten keinen signifikanten Anstieg des GBT-Zellgehaltes. Nur die intrazelluläre GBT-Konzentration der TC+ Behandlung war im Vergleich zu der Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 7.5 A und C). Als ein möglicher Grund für den geringen GBT-Anstieg wird die vergleichsweise hohe intrazelluläre GBT-Konzentration in den Kontrollkulturen angesehen (18 mmol L^{-1}). Es war nur ein geringfügiger (zum Teil nicht signifikanter) Anstieg notwendig, um eine Konzentration von über 25 mmol L^{-1} zu erreichen.

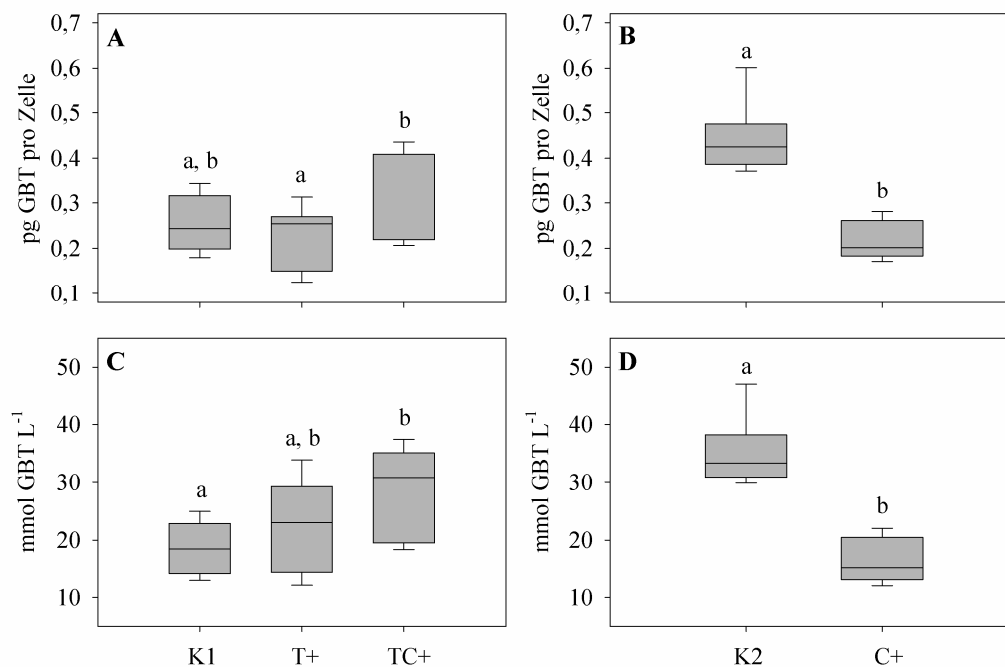


Abb. 7.5: (A, B) GBT-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre GBT-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *E. huxleyi* (kalzifizierend); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A und C) One Way ANOVA mit Tukey Post Hoc Test, (B und D) Mann-Whitney-Test.

Auffällig sind die Unterschiede der intrazellulären GBT-Konzentration zwischen den T+ und TC+ Behandlungen der nicht-kalzifizierenden und kalzifizierenden *E. huxleyi*. Hierfür konnte bislang keine Erklärung gefunden werden. Beide Arten sind genetisch identisch und unterscheiden sich nur im Phänotyp (zum Beispiel Ausbildung von Coccolithen). Die Funktion der Coccolithen ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. YOUNG (1987) sieht in den Kalkplättchen vor allem eine Schutzfunktion für die Zellmembran. Dieser mechanische Schutz kann aber eine Protein stabilisierung, wie sie durch GBT ausgeübt wird, nicht ersetzen, zumal die Ausbildung der Coccolithen mit steigender Temperatur abnimmt (SORROSA *et al.* 2005). Die

beobachteten Differenzen zeigen, dass die phänotypische Variabilität zwischen den beiden *E. huxleyi* Stämmen über die Kalzifizierung hinausgeht.

P. tricornutum und beide *E. huxleyi* Stämme zeigten eine signifikante Abnahme der GBT-Werte in den C+ Behandlungen (Abb. 7.3 bis Abb. 7.5 B und D). Bislang konnte keine Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden. Der Einfluss einer erhöhten CO₂-Konzentration auf die Salinität und damit auf die Osmoregulation der Zelle kann für die Seewasser-Matrix vernachlässigt werden (LOÁICIGA 2006). Die oben diskutierte Funktion von GBT als Membranstabilisator bei erhöhten Temperaturen würde vergleichbare Werte zwischen der Kontrolle und den C+ Behandlungen erwarten lassen.

7.3.4 DMSP

Die Diatomeen *T. pseudonana* und *P. tricornutum* wiesen im Vergleich zu den Coccolithophoriden *E. huxleyi* einen geringen DMSP-Gehalt pro Zelle auf. Darüber hinaus zeigten die Kalk- und Kieselalgen, anders als beim GBT, unterschiedliche Reaktionen auf erhöhte Temperatur und CO₂-Gehalt.

Sowohl *T. pseudonana* als auch *P. tricornutum* zeigten in den T+ und TC+ Behandlungen eine signifikante Abnahme des DMSP-Gehaltes pro Zelle (Faktor 1,75 bis 3,18) (Abb. 7.6 A und Abb. 7.7 A). Für die intrazelluläre DMSP-Konzentration in *P. tricornutum* konnte ebenfalls ein Rückgang beobachtet werden (Abb. 7.7 C). Aufgrund der Volumenreduktion bei Temperaturerhöhung fiel dieser aber vergleichsweise gering aus (Faktor 1,32 bzw. 1,67). Obwohl für *T. pseudonana* keine Volumenbestimmung vorgenommen werden konnte, wird hier aufgrund von eigenen Beobachtungen (kleinere Zellen bei höherer Temperatur) ein ähnlicher Effekt erwartet.

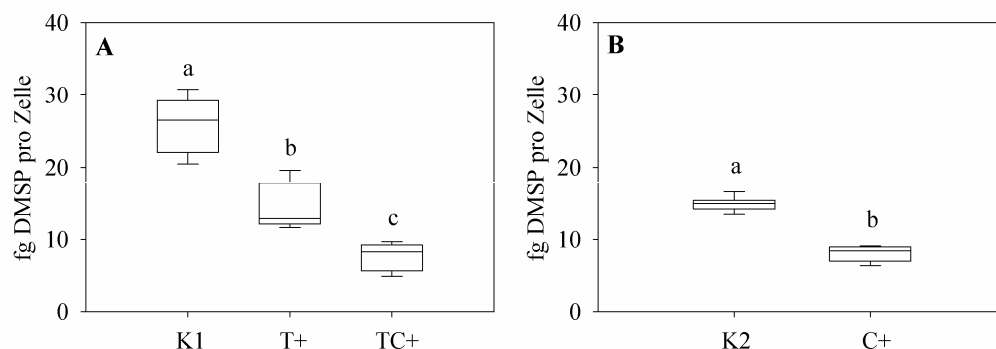


Abb. 7.6: DMSP-Gehalt pro Zelle in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *T. pseudonana*; unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A) One Way ANOVA (GBT) mit Tukey Post Hoc Test, (B) t-Test.

Aufgrund der geringen intrazellulären Konzentration ist eine zentrale Rolle von DMSP bei der Osmoregulation in den beiden Diatomeen-Kulturen unwahrscheinlich. KARSTEN *et al.* (1992) fanden für Makroalgen bei 0 °C höhere DMSP-Werte als für Kulturen bei 10 °C. Die Autoren erwägten als erstes eine mögliche Funktion von DMSP als Kryoprotektivum. Diese Funktion kann einen Rückgang von DMSP bei höheren Temperaturen erklären. Ähnlich wurde bereits in anderen Studien argumentiert, in denen eine Temperaturerhöhung zu niedrigeren DMSP-Zellgehalten führte (Temperaturbereich von 4 bis 23 °C, VAN RIJSEL und GIESKES 2002). Diese Argumentation trifft aber nur auf Kulturen bei Temperaturen von 10 °C oder weniger zu. In dem hier untersuchten Temperaturbereich von 14,5 bis 20,5 °C ist eine Begründung auf dieser Basis zweifelhaft. NISHIGUCHI und SOMERO (1992) fanden für DMSP bei höheren Temperaturen eine destabilisierende Wirkung auf Proteine. Die in den Diatomeen vorliegende intrazelluläre DMSP-Konzentration von weniger als 2 mmol L⁻¹ liegt aber deutlich unter der von den Autoren getesteten Konzentration (≥ 100 mmol L⁻¹), auch wenn aufgrund einer Kompartimentierung die lokale DMSP-Konzentration höher liegen könnte. Eine DMSP-Abnahme ist vor diesem Hintergrund unwahrscheinlich.

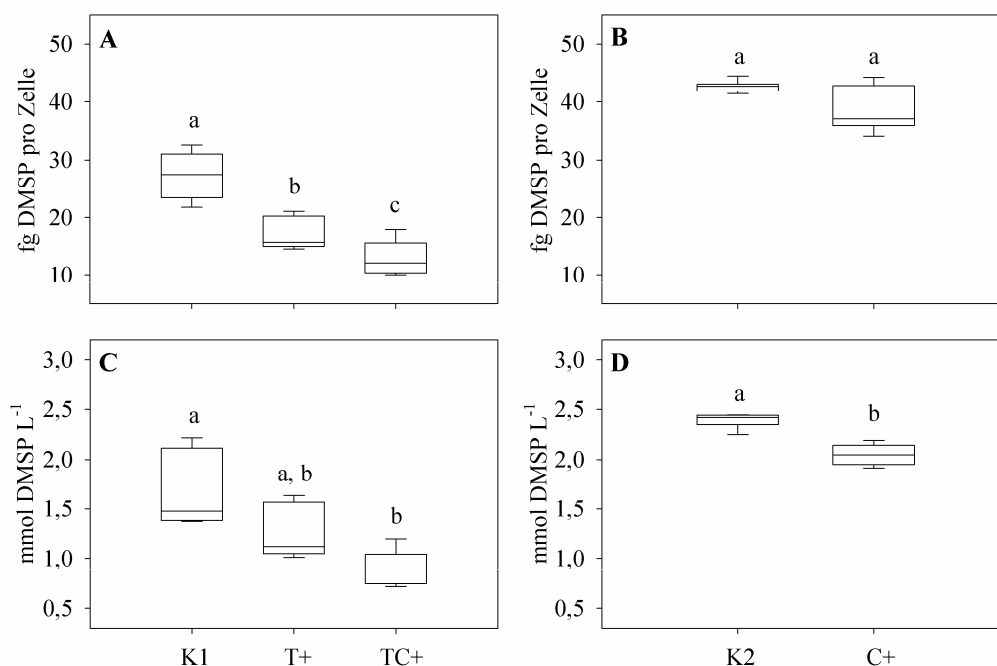


Abb. 7.7: (A, B) DMSP-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *P. tricornutum*; unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A) One Way ANOVA und (C) ANOVA on Ranks mit Tukey Post Hoc Test, (B) Mann-Whitney-Test (D) t-Test.

Die Diatomeen wiesen in den T+ und TC+ Behandlungen hohe Zellteilungsraten auf, die einer Verdreifachung bis Vervielfachung der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden entsprechen (Tab. 7.1). Dies wirkt sich auch auf die biochemische Zusammensetzung der Zellen aus. JØRGENSEN

(1968) fand für Kulturen von *Skeletonema costatum* mit steigender Kultivierungstemperatur neben einer steigenden Zellteilungsrate auch eine Abnahme des organischen Kohlenstoffs pro Zelle (vergleiche hierzu auch EPPLEY 1972 und enthaltene Referenzen). Vor diesem Hintergrund sind die niedrigeren DMSP-Werte der T+ und TC+ Behandlungen wahrscheinlich die Konsequenz einer verringerten Photosyntheserate der einzelnen Zelle.

Eine Erhöhung der CO₂-Konzentration sorgte ebenfalls für eine Abnahme der DMSP-Werte (Abb. 7.6 und Abb. 7.7). Der Effekt war bei *T. pseudonana* deutlicher zu beobachten als bei *P. tricornutum*. DMSP-Zellgehalte der TC+ Behandlungen waren für beide Diatomeen signifikant niedriger als die der T+ Behandlungen, was auf synergetische Effekte der Faktoren Temperatur und CO₂-Gehalt hinweist. Während der DMSP-Zellgehalt von *T. pseudonana* auch in der C+ Behandlung signifikant reduziert war, konnte für *P. tricornutum* nur für die intrazelluläre DMSP-Konzentration eine signifikante Abnahme beobachtet werden (Abb. 7.6 B und Abb. 7.7 B und D).

Der Rückgang von DMSP bei erhöhter CO₂-Konzentration kann auf die antioxidative Schutzfunktion des DMSP zurückgehen. BUCCIARELLI und SUNDA (2003) fanden für CO₂-limitierte Kulturen von *T. pseudonana* erhöhte intrazelluläre DMSP-Konzentrationen. Eine CO₂-Limitierung führt zu einem erhöhten oxidativen Stress durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (VARDI *et al.* 1999). Von einem erhöhten oxidativen Stress im Zusammenhang mit einer Erhöhung der CO₂-Konzentration wurde bislang nicht berichtet, so dass in den TC+ und C+ Behandlungen ein geringerer Bedarf an Antioxidantien die niedrigeren DMSP-Werte erklären kann. Im Widerspruch hierzu steht die erhöhte *in vivo* Fluoreszenz der TC+ und C+ Behandlungen von *T. pseudonana* (Tab. 7.3). Ein erhöhter Chl a Gehalt spräche für eine erhöhte Photosyntheserate und damit für eine potentiell höhere Menge an ROS. Wenn man den Einfluss einer erhöhten CO₂-Konzentration auf die Photosyntheserate betrachtet, befinden sich Diatomeen unter den heutigen Bedingungen bereits im Bereich der CO₂-Sättigung (BURKHARDT *et al.* 2001, ROST *et al.* 2003). Eine deutliche Steigerung der Photosyntheserate und damit auch der ROS-Konzentration ist nicht zu erwarten. Im Fall der TC+ Behandlung geht die erhöhte *in vivo* Fluoreszenz in erster Linie auf die Temperaturerhöhung zurück (BERGES *et al.* 2002).

GBT besitzt im Unterschied zu DMSP keine antioxidative Wirkung (YANCEY 2005). Die reduzierte intrazelluläre GBT-Konzentration in den C+ Behandlungen (siehe 7.3.3) kann somit nicht analog zu DMSP mit einem reduzierten oxidativen Stress erklärt werden.

Bei den Kulturen der Kalkalge *E. huxleyi* muss bei der Auswertung zwischen dem kalzifizierenden und nicht-kalzifizierenden Stamm unterschieden werden. Obwohl die beiden Stämme das gleiche Genom besitzen, bilden sie unterschiedliche Phänotypen aus. Es zeigte sich, dass phänotypische Unterschiede wie zum Beispiel die Bildung von Coccolithen einen Einfluss auf den DMSP-Gehalt der jeweiligen Behandlungen hatten.

Der DMSP-Gehalt pro Zelle war im Fall des nicht-kalzifizierenden Stammes für die T+ Behandlung nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle. Bezogen auf die intrazelluläre DMSP-Konzentration trat jedoch ein signifikanter Unterschied auf (Abb. 7.8 A und C).

Bei dem kalzifizierenden *E. huxleyi* Stamm konnte das umgekehrte Phänomen beobachtet werden. Der DMSP-Zellgehalt der T+ Behandlung war im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger. Im Fall der intrazellulären DMSP-Konzentration trat jedoch kein Unterschied auf (Abb. 7.9 A und C). Die Kalkalgen weisen damit einen anderen Trend als die Diatomeen auf.

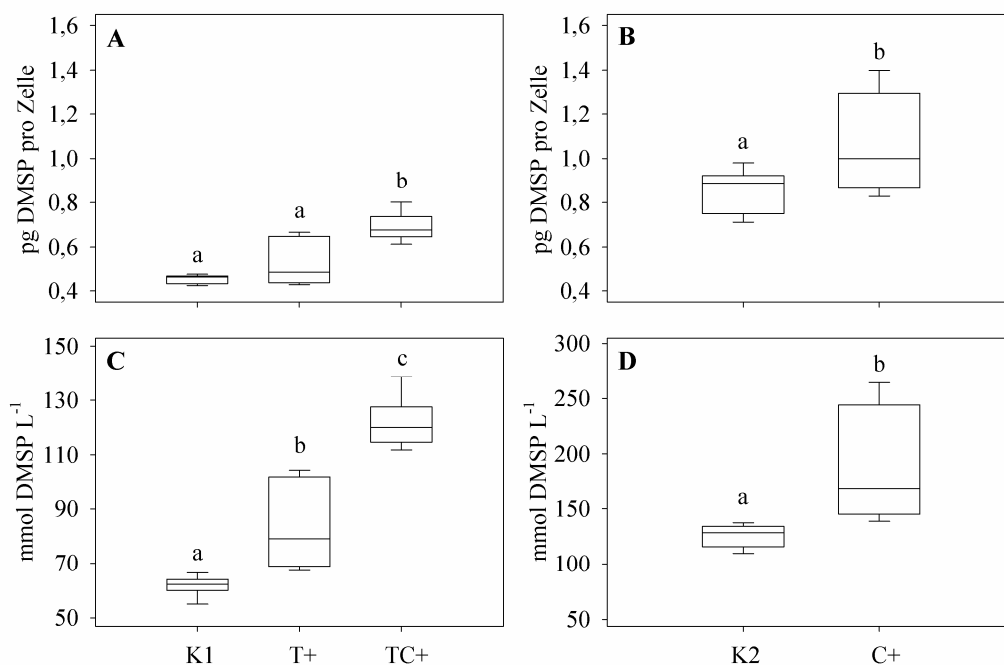


Abb. 7.8: (A, B) DMSP-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *E. huxleyi* (nicht-kalzifizierend); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A und C) ANOVA on Ranks mit Tukey Post Hoc Test, (B) t-Test, (D) Mann-Whitney-Test.

Im Unterschied zu den Diatomeen besitzen beide *E. huxleyi* Stämme eine intrazelluläre DMSP-Konzentration von über 35 mmol L⁻¹. DMSP liegt damit in einer für die Osmoregulation relevanten Konzentration vor (DICKSON und KIRST 1987). Aufgrund dieser Funktion wird auch bei höheren Kultivierungstemperaturen die intrazelluläre DMSP-Konzentration nicht reduziert. Die kalzifizierende *E. huxleyi* zeigt in der T+ Behandlung zwar einen signifikant geringeren

DMSP-Zellgehalt, die intrazelluläre DMSP-Konzentration bleibt aber aufgrund der Verringerung des Zellvolumens (Tab. 7.2) vergleichbar zur Kontrolle.

BALCH *et al.* (1992) zeigten für kalkifizierende *E. huxleyi* Kulturen, dass eine Temperaturerhöhung von 15 °C auf 20 °C keinen Einfluss auf die Photosyntheserate hat. Für nicht-kalkifizierende Kulturen liegen keine vergleichbaren Informationen vor. Es ist aber bekannt, dass nicht-kalkifizierende Kulturen allgemein eine höhere Photosyntheserate als kalkifizierende Kulturen haben (ROST und RIEBESELL 2004). Eine höhere Photosyntheserate würde für eine gesteigerte DMSP-Produktion sprechen. Dies kann ein Grund dafür sein, dass der DMSP-Zellgehalt der nicht-kalkifizierenden *E. huxleyi*, anders als beim kalkifizierenden Stamm, in der T+ Behandlung konstant bleibt. Aufgrund der Verringerung des Zellvolumens tritt dann ein signifikanter Unterschied bei der intrazellulären DMSP-Konzentration auf.

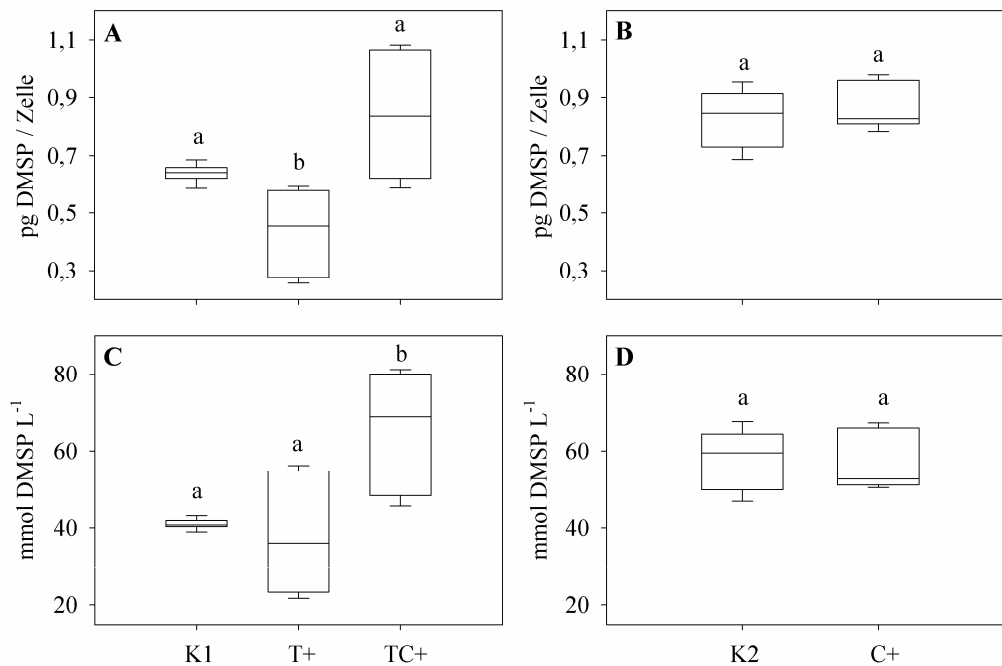


Abb. 7.9: (A, B) DMSP-Gehalt pro Zelle und (C, D) intrazelluläre DMSP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂-Gehalt in *E. huxleyi* (kalkifizierend); unterschiedliche Indizes innerhalb einer Grafik zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$); (A und C) ANOVA on Ranks mit Tukey Post Hoc Test, (B und D) t-Test.

Für beide *E. huxleyi* Stämme war die intrazelluläre DMSP-Konzentration in der TC+ Behandlung signifikant erhöht. Da T+ und TC+ Behandlungen vergleichbare Zellvolumina aufwiesen (Tab. 7.2), muss der Unterschied zwischen den beiden Behandlungen auf den erhöhten CO₂-Gehalt der Luft zurückgehen. Im Unterschied zu Diatomeen befinden sich Coccolithophoriden wie *E. huxleyi* unter den heutigen Bedingungen nicht an der CO₂-Sättigungsgrenze. Die Photosyntheserate kann mit steigender CO₂-Konzentration weiter zunehmen. Kalkulationen gehen dabei von einer möglichen Steigerung von bis zu 100% aus

(BEARDALL *et al.* 2009). Eine erhöhte Kohlenstoff-Fixierung wurde dabei sowohl für kalzifizierende als auch nicht-kalzifizierende Stämme von *E. huxleyi* gefunden (ROST *et al.* 2003, LEONARDOS und GEIDER 2005). Eine gesteigerte DMSP-Produktion kann in diesem Zusammenhang die Konzentration der Aminosäuren Cystein und Methionin auf einem niedrigen Niveau halten. Die Zelle beugt damit negativen Rückkopplungsmechanismen bei der Biosynthese von Aminosäuren vor (STEFELS 2000, vergleiche auch Kapitel 5.2.3).

Die nicht-kalzifizierende *E. huxleyi* zeigte auch in der C+ Behandlung einen signifikanten Anstieg der DMSP-Werte (Abb. 7.8 B und D). Dies spricht erneut für eine gesteigerte Photosyntheserate bei einem höheren CO₂-Gehalt. Im Unterschied hierzu konnte bei dem kalzifizierenden Stamm kein signifikanter Unterschied zwischen C+ Behandlung und Kontrolle beobachtet werden (Abb. 7.9 B und D). Da beide Stämme genetisch identisch sind, muss ein Unterschied im Phänotyp, wie zum Beispiel die Kalzifizierung, die Ursache für diese Differenzen sein.

Die Bildung der Coccolithen erfolgt ausgehend von Hydrogencarbonat. Hydrogencarbonat steht im Gleichgewicht mit CO₂ und Carbonat, die Lage des Gleichgewichts ist von dem pH-Wert abhängig. Ein niedrigerer pH-Wert führt zu einer erhöhten Hydrogencarbonat-Konzentration. Der Effekt wird verstärkt, wenn die Absenkung des pH-Werts durch Einleiten von CO₂ und nicht durch Zusatz von Säure herbeigeführt wird (HURD *et al.* 2009). Die Kalzifizierung wird durch eine höhere Hydrogencarbonat-Konzentration gefördert (SHIRAIWA 2003).

Bisherige Studien zur Kalzifizierung von *E. huxleyi* unter erhöhten CO₂-Bedingungen liefern unterschiedliche Ergebnisse. RIEBESELL *et al.* (2000) fanden eine um 16% reduzierte Kalzifizierung. Im Gegensatz hierzu berichten IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* (2008a) von einer Verdopplung der Kalzifizierung. Diese unterschiedlichen Ergebnisse führten bereits zu Diskussionen (RIEBESELL *et al.* 2008, IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* 2008b).

Wie schon BEARDALL *et al.* (2009) und HURD *et al.* (2009) hervorgehoben haben, ist ein Vergleich der bislang vorgenommenen Studien schwierig, da die Simulation höherer CO₂-Gehalte auf unterschiedlichen Wegen erfolgte. RIEBESELL *et al.* (2000) passten auf Grundlage von Prognosen über den zukünftigen pH-Wertes des Meerwassers die simulierten CO₂-Gehalte durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge zum Kulturmedium an. Dieser Ansatz berücksichtigt jedoch nicht, dass höhere CO₂-Gehalte nicht nur den pH-Wert absenken, sondern auch die Konzentration des DIC erhöhen (IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* 2008a). IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* (2008a) sehen deswegen in dem Einleiten CO₂-reicher Luft in die Kultur die bessere Alternative. Für eine endgültige Beantwortung der Frage, durch welches Design der

Einfluss höherer CO₂-Gehalte am besten untersucht werden kann, brauche es aber weitere Untersuchungen (HURD *et al.* 2009).

Da analog zu IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* (2008a) Luft mit erhöhtem CO₂-Gehalt für die Untersuchungen verwendet wurde, ist eine höhere Kalzifizierung der *E. huxleyi* Zellen möglich. Um einen Einfluss des erhöhten CO₂-Gehaltes auf die Coccolithen festzustellen, wurden die Zellen anhand von Elektronenmikroskop-Aufnahmen untersucht (Abb. 7.10). Es konnten im Fall der C+ Behandlung keine augenscheinlichen Fehlkonstruktionen der Coccolithen festgestellt werden. RIEBESELL *et al.* (2000) fanden bei den mit Säure behandelten Kulturen missgebildete Coccolithen vor. DE BODT *et al.* (2010) wiesen mit steigendem CO₂-Gehalt einen höheren Anteil an missgebildeten Coccolithen nach. IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* (2008a) zeigten mit steigendem CO₂-Gehalt Coccolithen mit zunehmender Größe, an denen sie nach eigenen Angaben keine deutlichen Fehlkonstruktionen vorfinden konnten. Die Coccolithen der C+ Behandlung erscheinen größer (Abb. 7.10). Genauere Messungen bezüglich der Coccolithen-Größe wurden jedoch nicht vorgenommen, so dass hier nur Vermutungen angestellt werden können.

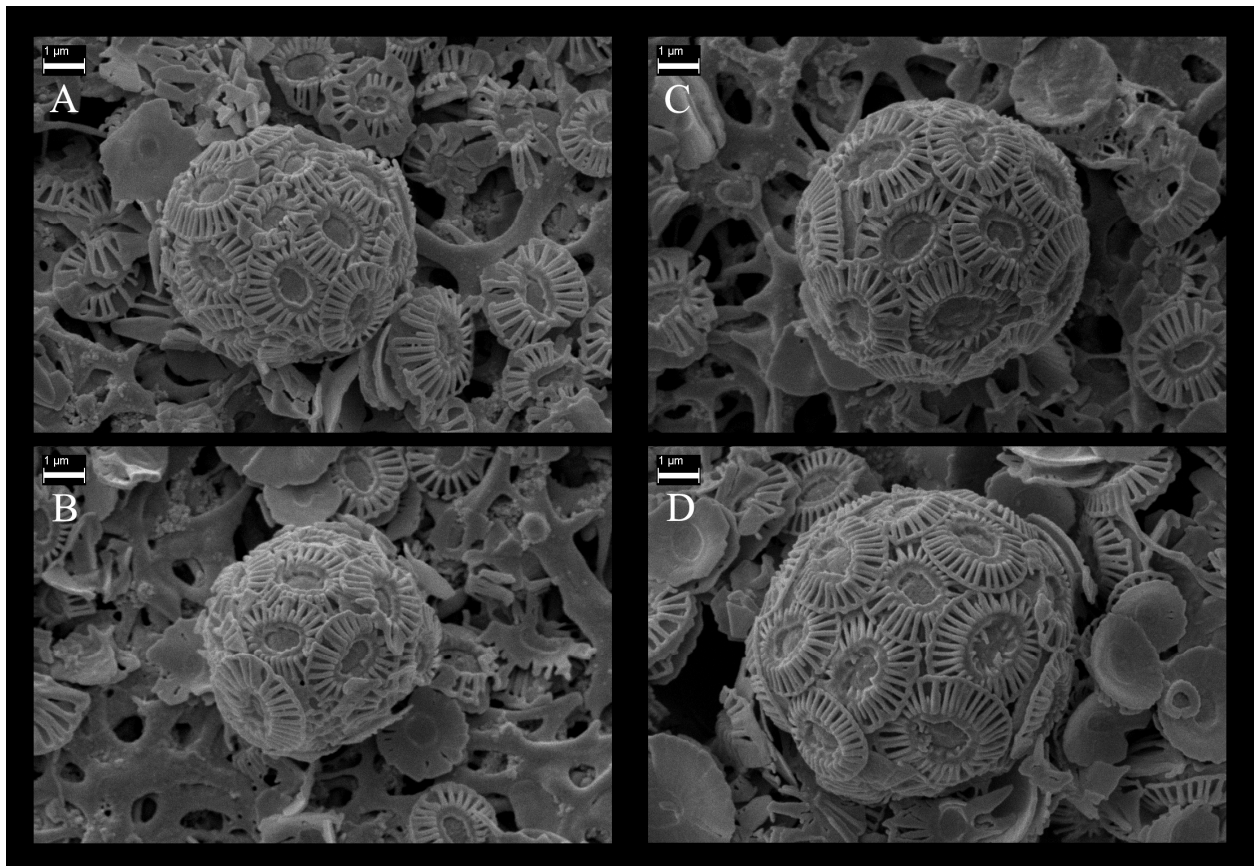


Abb. 7.10: Elektronenmikroskop-Aufnahmen für *E. huxleyi* (kalzifizierend); (A, B) Kontrolle, (C, D) C+ Kultur; 8000fache Vergrößerung; Maßstab zeigt 1 µm.

Unter der Annahme, dass in der C+ Behandlung eine erhöhte Kalzifizierung vorliegt, können die vergleichbaren DMSP-Werte in der Kontrolle und der C+ Behandlung erklärt werden (Abb. 7.9 B und D). Im Unterschied zu dem nicht-kalzifizierenden Stamm wird die erhöhte DIC-Konzentration nicht (vollständig) für die Photosynthese, sondern für die Ausbildung der Coccolithen verwendet. In diesem Fall muss keinem eventuellen Rückkopplungsmechanismus im Zusammenhang mit der Aminosäurebiosynthese über eine gesteigerte DMSP-Produktion vorgebeugt werden.

Eine Abnahme der DMSP-Werte wird nicht beobachtet, da die Kalzifizierung unabhängig von der Photosynthese stattfindet. Eine gesteigerte Kalzifizierungsrate hat somit keinen negativen Einfluss auf die Kohlenstoff-Fixierung (HERFORT *et al.* 2004, IGLESIAS-RODRIGUEZ *et al.* 2008a).

Die Beobachtung in der C+ Behandlung scheint im Widerspruch zu dem oben erklärten Anstieg von DMSP in der TC+ Behandlung zu stehen. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass der Prozess der Kalzifizierung temperaturabhängig ist (SORROSA *et al.* 2005). BALCH *et al.* (1992) fanden für *E. huxleyi* eine um bis zu Faktor zwei reduzierte Kalzifizierung, wenn Kulturen bei 20 °C mit Kulturen bei 15 °C verglichen wurden. Damit kann bei höheren Temperaturen ein erhöhter CO₂-Gehalt auch in kalzifizierenden Kulturen zu einer Steigerung der DMSP-Produktion führen.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass eine Vorhersage über die Entwicklung des DMSPp im Zusammenhang mit dem Klimawandel schwierig ist. Der Vergleich von unterschiedlichen Phytoplankton-Kulturen zeigte, dass kein allgemeingültiger Trend für diesen Metaboliten vorliegt. Diatomeen wiesen eine reduzierte DMSP-Produktion auf. Im Unterschied hierzu konnte bei den Kulturen der Kalkalgen eine gesteigerte DMSP-Produktion nachgewiesen werden. Allerdings wurden selbst bei Kulturen mit gleichem Genom aber unterschiedlichem Phänotyp verschiedene Reaktionen auf die äußeren Faktoren Temperatur und CO₂-Gehalt ausgemacht. Gerade dieses Beispiel zeigt, wie vielschichtig der Einfluss dieser Parameter schon bei unialgalen Kulturen sein kann.

Darüber hinaus konnten synergetische Effekte beobachtet werden. Dies zeigt sich zum Beispiel in den DMSP-Zellgehalten bei *T. pseudonana* und *P. tricornutum*, die in den TC+ Behandlungen signifikant niedriger als in den T+ Behandlungen waren. Untersuchungen, die nur einen der beiden Parameter Temperatur und CO₂-Gehalt variieren, können somit kein vollständiges Bild liefern. Dies zeigt sich auch deutlich in der kalzifizierenden Kultur von *E. huxleyi*. Während in den C+ und T+ Behandlungen kein Einfluss des erhöhten CO₂-Gehaltes oder der Temperatur auf

die intrazelluläre DMSP-Konzentration gefunden wurde, zeigte sich in den TC+ Behandlungen ein signifikanter Anstieg.

Die Verwendung unialgaler Kulturen kann sicherlich nicht allein für Vorhersagen über die Entwicklung von DMSP im marinen Ökosystem herangezogen werden. Die gesamte Planktonstruktur wird von äußeren Faktoren beeinflusst, wie es bereits in Feldstudien beobachtet wurde. TORTELL *et al.* (2002) berichteten bei einem erhöhten CO₂-Gehalt von einem Rückgang der Diatomeen, während Arten wie zum Beispiel *Phaeocystis* sp. an Bedeutung gewannen. Es liegen aber auch Studien vor, in denen kein Unterschied beobachtet wurde (zusammengefasst von BEARDALL *et al.* 2009).

Ein anderes Beispiel für einen derartigen Gegensatz ist die Entwicklung der DMS-Emissionen in Mesokosmos-Studien unter dem Einfluss höherer CO₂-Gehalte. WINGENTER *et al.* (2007) berichteten von erhöhten Emissionen, HOPKINS *et al.* (2010) fanden hingegen niedrigere Werte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass WINGENTER *et al.* (2007) eine von *E. huxleyi* dominierte Algenblüten vorfanden. Bei HOPKINS *et al.* (2010) dominierten unterschiedliche Flagellaten die Phytoplankton-Zusammensetzung. Unterschiede zwischen den beiden Studien könnten somit schon auf verschiedene Artenzusammensetzungen zurückgehen. Dies zeigt, wie hoch der Bedarf an weiteren systematischen Untersuchungen ist. Die Simulation des Klimawandels in Laborstudien ist ein hilfreicher Schritt, um Beobachtungen in Feldstudien interpretieren zu können.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die zwitterionische Verbindung DMSP ist ein zentraler Schwefelmetabolit im aquatischen Ökosystem. Die Quantifizierung dieser Verbindung wurde bislang vorwiegend anhand von indirekten Analysemethoden vorgenommen. Durch die Einwirkung von Basen werden aus DMSP Acrylsäure und die leichtflüchtige Verbindung DMS freigesetzt. Letztere kann mit Hilfe der GC analysiert werden. In der Vergangenheit wurden jedoch auch andere potentielle biogene DMS-Vorstufen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine direkte Bestimmung des DMSP angestrebt. Hierfür wurden mehrere LC/MS-Methoden entwickelt und validiert. Die Analyse des DMSP kann entweder nach der Derivatisierung mit PDAM mit RP-LC/MS erfolgen oder nach einer Verdünnung des Zellextraktes mit Acetonitril mit Hilfe der HILIC-LC/MS vorgenommen werden. Die Anwendung der Kombination aus ZIC-HILIC und LC/MS bietet den vielversprechendsten Ansatz im Hinblick auf die chromatographische Trennung verschiedener (zwitter-)ionischer Verbindungen. Dies ist insbesondere für zukünftige Metaboliten-Untersuchungen von Bedeutung.

Für die Analyse des in Seewasser gelösten DMSP wurden mehrere Verfahren für eine Aufkonzentrierung des Analyten getestet. Die Anwendung des ZIC-HILIC-Materials für eine Festphasenextraktion stellt den besten Ansatz dar, da selbst aus der Seewassermatrix eine Anreicherung des DMSP erfolgen konnte. Für die Anwendung bei Konzentrationen unter 40 nmol L^{-1} muss noch eine weitere Optimierung der Festphasenextraktion und/oder der LC/MS-Methode erfolgen.

Ein Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung von DMSP zeigte, dass DMSP zwar die dominante, aber nicht die einzige DMS-Quelle im Phytoplankton darstellt. Als weitere DMS-Vorstufen konnten Gonyol und DMS-Acetat nachgewiesen werden. Beide Verbindungen zeigten nach Baseneinwirkung eine Bildung von DMS. Diese erfolgte aber im Unterschied zu DMSP nicht quantitativ. Es müssen somit noch andere DMS-Vorstufen im Plankton vorliegen. Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen sollte das Ziel weiterer Untersuchungen sein. Nur so kann ermittelt werden, inwieweit diese Verbindungen durch enzymatischen und/oder abiotischen Abbau zu den Schwefel-Emissionen der Ozeane beitragen.

Anhand der Diatomee *Skeletonema marinoi* konnte gezeigt werden, dass der DMSP-Zellgehalt von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Der DMSP-Gehalt pro Zelle hängt nicht nur von der Stickstoff-Verfügbarkeit ab. Er wird auch durch den Tagesrhythmus und die Wachstumsphase beeinflusst. Der hohe DMSP-Zellgehalt der Diatomeen-Kultur in der

stationären Phase steht im Gegensatz zu der allgemeinen Aussage Diatomeen seien schwache DMSP-Produzenten. Der DMSP-Zellgehalt kann sich bei Nährstoff-Verarmung beachtlich ändern, so dass Diatomeen DMSP-Zellgehalte erreichen, die mit starken DMSP-Produzenten wie *Emiliania huxleyi* vergleichbar sind. Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der direkten Analyse von DMSP mit indirekten Methoden, dass im Verlauf des Wachstums andere DMS-Vorstufen an Bedeutung gewinnen. Auch hier ist noch eine Strukturaufklärung der verantwortlichen Verbindungen notwendig. Nur so können Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen der Verbindungen erhalten werden.

Mit Hilfe von doppeltmarkiertem DMSP konnte der Aufnahmemechanismus dieser Verbindung in verschiedenen Phytoplankton-Kulturen analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass alle untersuchten Phytoplankton-Arten DMSP direkt und ohne vorherige Transformation aufnahmen. Bemerkenswert ist dabei, dass die DMSP-Aufnahme auch durch Organismen erfolgen kann, die kein DMSP synthetisieren. Dies bestätigt bisherige Forschungsergebnisse, dass die Aufnahme von Zwitterionen über ein selektives, aber nicht spezifisches Transportsystem erfolgt. Sich an diese Ergebnisse anschließende Studien sollten auch Arten einschließen, die weder DMSP noch GBT produzieren. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, wie weit Transportsysteme für derartige Zwitterionen im Plankton verbreitet sind.

Die Aufnahme von DMSP erfolgte bei zwei getesteten Arten nach dem Zusatz innerhalb der ersten 20 Minuten. Dieses Ergebnis zeigt, wie hoch die Affinität von marinen Organismen zu reduzierten Schwefelverbindungen ist. Weitere Studien zur DMSP-Aufnahme und Kinetik sollten auch heterotrophe Organismen wie zum Beispiel Bakterien einschließen. Bei Bakterien ist bekannt, dass einige ihren Schwefelbedarf ausschließlich mit Hilfe von DMSP abdecken. Bei Phytoplankton-Kulturen konnte eine direkte und unveränderte Aufnahme und Speicherung von DMSP beobachtet werden. Im Fall von Bakterien wird eine schnelle Verwertung erwartet. Hier kann die ZIC-HILIC-Methode (auch in Kombination mit einer statistischen Auswertung) Informationen über die Metabolisierung von DMSP liefern.

Anhand verschiedener Phytoplankton-Kulturen wurde die Auswirkung von zwei Faktoren des Klimawandels (höhere Temperatur, höherer CO₂-Gehalt der Luft) auf die GBT und DMSP-Produktion der Zellen untersucht. Im Hinblick auf den GBT-Zellgehalt und die intrazelluläre GBT-Konzentration zeigten alle Kulturen vergleichbare Reaktionen mit steigenden GBT-Werten bei Temperaturerhöhung. Dies wird auf die proteinstabilisierende Funktion von GBT bei höheren Temperaturen zurückgeführt.

Im Hinblick auf die DMSP-Produktion zeigten die Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* und *Phaeodactylum tricornutum* abnehmende DMSP-Werte mit der Erhöhung der Temperatur und des CO₂-Gehaltes. Im Unterschied hierzu wurde bei zwei Stämmen der Kalkalge *Emiliana huxleyi* kein Einfluss der Temperatur auf die DMSP-Produktion festgestellt. Der Einfluss eines höheren CO₂-Gehaltes hatte unterschiedliche Auswirkungen, es wird bei der kalkifizierenden *E. huxleyi* ein zusätzlicher Einfluss auf die Coccolithen vermutet. Bei Erhöhung der Temperatur und des CO₂-Gehaltes zeigten beide Kalkalgen eine erhöhte DMSP-Produktion. Die Zelle könnte dies für den Ausgleich eines Energieüberschusses nutzen, da ein erhöhter CO₂-Gehalt bei *E. huxleyi* eine Steigerung der Photosyntheserate zur Folge hat.

Diese Ergebnisse zeigen, wie komplex der Einfluss von Temperatur und CO₂-Gehalt schon auf einen einzelnen Metaboliten sein kann. Diese Komplexität wird durch synergetische Effekte zusätzlich erhöht. Die zukünftige Entwicklung des partikulären DMSP im marinen Ökosystem hängt von vielen Faktoren ab. Allein auf Grundlage dieser Ergebnisse und der Literatur kann keine Abschätzung vorgenommen werden. Es wird jedoch deutlich, dass die Artenzusammensetzung im Plankton eine entscheidende Rolle dabei spielen wird, wie sich die DMSP-Konzentration und damit auch die Konzentration des klimarelevanten DMS entwickeln werden.

9 Experimenteller Teil

9.1 Geräte

Für LC/MS Analysen wurde eine AcquityTM Ultraperformance LC (Waters, Milford, MA, USA) verwendet, die mit einem Q-ToF MicroMass Spektrometer verbunden war (Waters Micromass, Manchester, England).

Die GC/MS-Analysen wurden mit Hilfe des PE Autosystem XL durchgeführt, das mit einem Quadrupol MS PE Turbomass verbunden war (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland).

Für NMR Messungen wurden Bruker Avance 200 und 400 MHz Spektrometer verwendet.

Fluoreszenz-Messungen erfolgten über den Mikrotiterplatten-Leser Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland).

UV/Vis Messungen wurden mit dem Specord M42 durchgeführt (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Elektronenmikroskop-Aufnahmen erfolgten mit einem LEO 1450 VP (Zeiss, Oberkochen).

Messungen des pH-Wertes wurden mit einem consort C830 Multi-Parameter Analyser durchgeführt.

9.2 Datenauswertung

Die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit der Software MassLynx® 4.1. Die Peakintegration erfolgte mit dem Programm QuanLynx®. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft® Office Excel® 2007. Die statistische Auswertung wurde mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt, weitere Details sind im Zusammenhang mit den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

9.3 Analysenmethoden

9.3.1 UPLC/MS Methode – Derivatisierte Proben

Für die Trennung wurde eine Acquity UPLCTM BEH Phenylsäule verwendet (1,7 µm, 2,1 x 50 mm). Als Eluent diente ein System aus (A) Wasser/Methanol/Tetrahydrofuran (60:20:20; v/v/v) mit 0,1 Vol.-% Ameisensäure und (B) Wasser/Methanol/Tetrahydrofuran (5:47,5:47,5; v/v/v) mit 0,1 Vol.-% Ameisensäure. Die Säulentemperatur wurde auf 35 °C gesetzt, Proben wurden im Autosampler bei 10 °C aufbewahrt. Die Injektion von 1 bis 10 µL erfolgte über eine Injektionsschleife. Die Totzeit des Systems betrug 0,3 Minuten. Als Waschlösungen für die Injektionsnadel wurden Methanol/Tetrahydrofuran (2:1 v/v, strong wash) und Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril (weak wash) verwendet.

Folgende MS-Parameter wurden verwendet: Kapillarspannung 3000 V, Probenkonus 10 V, Quelltemperatur 150 °C, Desolvatationstemperatur 300 °C, Cone-Gas 150 L h⁻¹, Desolvatationsgas 750 L h⁻¹, Kollisionsenergie 5 V, Ionenenergie 1,8 V.

Die massenselektive Detektion erfolgte im ESI⁺-Modus. Der Massenbereich wurde abhängig von der Problemstellung von 345 bis 360 *m/z* (DMSP Analyse), 330 bis 360 *m/z* (DMSP und GBT Analyse) oder 330 bis 385 *m/z* (Analyse anderer DMS-Vorstufen) aufgezeichnet. Die scan-Dauer lag bei 0,44 Sekunden mit einem interscan delay von 0,05 Sekunden.

Tab. 9.1: Gradient für die Analyse von DMSP-PDAM

Zeit [min]	Fluss [ml min ⁻¹]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
		H ₂ O/Methanol/THF (60:20:20; v/v/v mit 0,1 Vol.-% HCOOH)	H ₂ O/Methanol/THF (5:47,5:47,5; v/v/v mit 0,1 Vol.-% HCOOH)
0,00	0,45	100	0
1,50	0,45	100	0
2,00	0,45	0	100
3,50	0,45	0	100
4,00	0,45	100	0
5,00	0,45	100	0

9.3.2 UPLC/MS-Methode – HILIC

Für die Trennung wurde eine Acquity UPLCTM BEH HILIC-Säule verwendet (1,7 µm, 2,1 x 50 mm). Als Eluent diente ein System aus (A) Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril und (B) Acetonitril. Die Säulentemperatur wurde auf 27 °C gesetzt, Proben wurden im Autosampler bei 4 °C aufbewahrt. Die Injektion von 1 bis 5 µL erfolgte über eine Injektionsschleife. Die Totzeit des Systems betrug 0,6 Minuten. Als Waschlösungen für die Injektionsnadel wurden Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril (strong wash) und Acetonitril (weak wash) verwendet.

Tab. 9.2: Gradient für die Analyse von DMSP (HILIC)

Zeit [min]	Fluss [ml min ⁻¹]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
		H ₂ O mit 2 Vol.-% Acetonitril	Acetonitril
0,00	0,25	10	90
0,40	0,25	10	90
0,41	0,25	60	40
1,70	0,25	60	40
1,90	0,60	60	40
2,65	0,60	60	40
2,70	0,25	10	90
4,00	0,25	10	90

Folgende MS-Parameter wurden verwendet: Kapillarspannung 3000 V, Probenkonus 10 V, Quelltemperatur 120 °C, Desolvatationstemperatur 300 °C, Cone-Gas 25 L h⁻¹, Desolvatationsgas 600 L h⁻¹, Kollisionsenergie 5 V, Ionenenergie 1,8 V.

Die massenselektive Detektion erfolgte im ESI⁺-Modus. Der Massenbereich wurde von 105 bis 200 *m/z* aufgezeichnet. Die scan-Dauer betrug 0,60 Sekunden mit einem interscan delay von 0,10 Sekunden.

9.3.3 HPLC/MS-Methode – ZIC-HILIC

Für die Trennung wurde eine ZIC®-HILIC-Säule von Merck verwendet (bezogen über di2chrom, Marl, Deutschland; 3,5 µm, 2,1 x 100 mm). Als Eluent diente ein System aus (A) Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril und 0,1 Vol.-% Ameisensäure und (B) Acetonitril/Wasser (9:1 *v/v*) mit 5 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat. Die Säulentemperatur wurde auf 35 °C gesetzt, Proben wurden im Autosampler bei 4 °C aufbewahrt. Die Injektion von 1 bis 20 µL erfolgte über eine Injektionsschleife. Als Waschlösungen für die Injektionsnadel wurden Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril (strong wash) und Acetonitril (weak wash) verwendet.

Tab. 9.3: Gradient für die Analyse von DMSP (ZIC-HILIC)

Zeit [min]	Fluss [ml min ⁻¹]	Lösung A [%] H ₂ O mit 2 Vol.-% Acetonitril und 0,1 Vol.-% HCOOH	Lösung B [%] Acetonitril/H ₂ O (90:10 <i>v/v</i>) mit 5 mmol L ⁻¹ NH ₄ Acetat
0,00	0,45	0	100
1,00	0,45	0	100
6,50	0,45	80	20
7,10	0,45	0	100
10,00	0,45	0	100

Folgende MS-Parameter wurden verwendet: Kapillarspannung 3000 V, Probenkonus 10 V, Quelltemperatur 120 °C, Desolvatationstemperatur 300 °C, Cone-Gas 25 L h⁻¹, Desolvatationsgas 650 L h⁻¹, Kollisionsenergie 3 V, Ionenenergie 1,8 V.

Die massenselektive Detektion erfolgte im ESI⁺-Modus. Der Massenbereich wurde von 105 bis 200 *m/z* aufgezeichnet. Die scan-Dauer betrug 0,60 Sekunden mit einem interscan delay von 0,10 Sekunden. Um den Salzeintrag in die Schnittstelle zwischen UPLC und MSD zu verringern, wurde ein solvent-delay von 0,1 bis 1,0 und von 8,0 bis 10,0 Minuten eingefügt. Die Totzeit des Systems liegt innerhalb des ersten solvent-delays.

9.3.4 GC/MS-Methode

Die Trennung erfolgte auf einer CP Volamine Säule (15 m x 0,32 mm, Varian, Darmstadt, Deutschland). Helium diente als Trägergas (30 kPa). Das Ofenprogramm startete bei 40 °C (2,5 Minuten) und die Temperatur wurde auf 180 °C (20 °C min⁻¹) erhöht. Die Injektion erfolgte splitlos bei einer Injektortemperatur von 250 °C. Transferlinie und Detektor wurden bei einer Temperatur von 200 bzw. 250 °C gehalten.

Die massenselektive Detektion erfolgte im EI⁺-Modus. Der Massenbereich wurde von 35 bis 400 *m/z* aufgezeichnet. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV, die scan-Dauer lag bei 1 Sekunde mit einem interscan delay von 0,1 Sekunden.

9.4 Synthesen

9.4.1 Synthese von DMSP, D₆-DMSP und ¹³C₂D₆-DMSP

Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von CHAMBERS *et al.* (1987). Zu 1 mL Acrylsäure (14,6 mmol) in 15 mL Dichlormethan wurden bei Raumtemperatur 2,5 mL Dimethylsulfid (34,2 mmol) gegeben (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Anschließend wurde für 20 Minuten Chlorwasserstoff in die Lösung eingeleitet. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und in Methanol/Diethylether (1:2 *v/v*) umkristallisiert. Man erhält das Produkt als weiße Nadeln mit einer Ausbeute von 68% und einer Reinheit von über ≥95%.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol [D₄]): 3,53 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,8 Hz), 2,96 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,8 Hz), 2,97 (s, 6H)

¹³C-NMR (100 MHz, Methanol [D₄]): 173,44 (s), 40,68 (s), 29,67 (s), 26,30 (s)

Die Synthese des sechsfach deuterierten DMSP erfolgte analog. Hierfür wurden zu 0,5 mL Acrylsäure (7,3 mmol) in 10 mL Dichlormethan 1,25 mL D₆-DMS (34,2 mmol) gegeben (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Der Deuterierungsgrad wurde zusätzlich mittels LC/MS überprüft (vergleiche Abb. 3.3 B, Deuterierungsgrad über 95%). Es wurden Reinheiten von ≥95% erreicht bei einer Ausbeute von 74%.

¹H-NMR (200 MHz, Methanol [D₄]): 3,53 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,8 Hz), 2,97 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,8 Hz)

¹³C-NMR (50 MHz, Methanol [D₄]): 173,44 (s), 40,42 (s), 29,67 (s), 25,42 (septett)

Die Synthese des ¹³C₂D₆-DMSP erfolgte durch Björn Gebser (GEBSER 2010).

9.4.2 Synthese weiterer DMS-Vorstufen

S-Methylmethionin (SMM) war kommerziell erhältlich (Alfa, Karlsruhe, Deutschland). Die Synthese des Hydrochlorids von 3-Dimethylsulfonium-2-methylpropionat (DMS-2-MP) erfolgte analog zu CHAMBERS *et al.* (1987), ausgehend von 1,24 mL (14,6 mmol) Methacrylsäure (Alfa, Karlsruhe, Deutschland) und 2,5 mL (34,2 mmol) Dimethylsulfid. Das Produkt wurde zunächst als klares, farbloses Öl erhalten, das als weißer Feststoff auskristallisiert. Es wurde eine Ausbeute von 75% mit einer Produktreinheit von $\geq 90\%$ erreicht.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O): 3,49-3,21 (m, 2H), 3,00-2,89 (m, 1H), 2,77 (s, 6H), 1,19 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz)

Das Hydrobromid von 2-Dimethylsulfoniumacetat (DMS-Acetat) wurde nach HOWARD und RUSSEL (1997) hergestellt. Hierfür wurden 3,83 g (27,5 mmol) Bromessigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 2,5 mL (34,2 mmol) Dimethylsulfid für 2 Minuten auf 55 °C erhitzt. Das Produkt wurde durch Zusatz von Diethylether zur abgekühlten Reaktionslösung als weißer Feststoff erhalten. Es wurde eine Ausbeute von 25% mit einer Produktreinheit von $\geq 90\%$ erreicht.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, Methanol [D_4]): 4,47 (s, 2H), 3,00 (s, 6H)

Die Synthese von 4-Dimethylsulfonium-2-methoxybutyrat erfolgte in drei Schritten ausgehend von α -Hydroxy- γ -butyrolacton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) (Abb. 9.1).

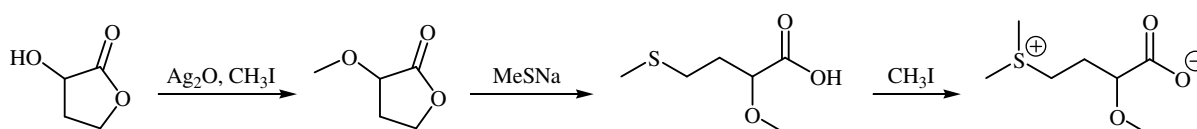


Abb. 9.1: Syntheschema für 4-DMS-2-methoxybutyrat.

Nach CAPON *et al.* (2005) wurden 1,42 mL (18,3 mmol) des Lactons zusammen mit 11 mL (179 mmol) Iodmethan (Alfa, Karlsruhe, Deutschland) und 17,8 g (77 mmol) Silberoxid (hergestellt nach BUSCH *et al.* 1936) eine Stunde in 50 mL Dichlormethan unter Rückfluss erhitzt. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat bei vermindertem Druck eingedunstet. Das Produkt wurde als klare schwach gelbe Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 92% und einer Reinheit von 80% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 4,42-4,40 (m, 1H), 4,28-4,16 (m, 1H), 4,00 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz), 3,55 (s, 3H), 2,57-2,41 (m, 1H), 2,31-2,19 (m, 1H)

Zu 1,25 g (10,8 mmol) α -Methoxy- γ -butyrolacton (Rohprodukt) wurden 900 mg (12,8 mmol) Methanthiolat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 8 mL Methanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 7 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Methanol und überschüssiges Methanthiolat wurden im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wurde mit 9 mL 1 mol L⁻¹ Salzsäure in einen Scheidetrichter überführt und viermal mit 15 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde bei vermindertem Druck eingeeengt (REPPE *et al.* 1955, WILLIAMS *et al.* 1985).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3,42 (s, 3H), 2,59 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,2 Hz), 2,07 (s, 3H), 2,05-1,97 (m, 2H); Signal des Protons am α -Kohlenstoff konnte wegen vorhandener Verunreinigungen nicht zugeordnet werden.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 176,1; 78,4; 58,5; 31,8; 29,6; 15,2.

Das NMR zeigte neben dem Produkt 4-Methylthio-2-methoxybuttersäure auch einen hohen Anteil an Edukt und Verunreinigungen. Eine Aufreinigung war nicht möglich, so dass mit dem Rohprodukt weiter verfahren wurde.

In einem braunen 4 mL Glasvial wurden 66 mg des Rohprodukts mit 650 μ L Ameisensäure, 200 μ L Essigsäure und 100 μ L Iodmethan versetzt und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt (TOENNIES und KOLB 1945). Die Lösung wurde im Stickstoffstrom eingeeengt und der Rückstand in 1 mL D₂O aufgenommen. Die Lösung wurde über eine Chromabond® EASY-Säule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gegeben, die vorher mit 1 mL D₂O gewaschen worden war. Das klare farblose Eluat wurde direkt für das NMR verwendet. Ameisensäure diente als interner Standard für das ¹³C-NMR.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 3,83-3,77 (m, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,29-3,18 (m, 2H), 2,76 (s, 3H), 2,75 (s, 3H), 2,25-1,99 (m, 2H)

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): 176,2; 78,8; 57,2; 39,9; 26,3; 24,6; 24,3

Die Synthese von Gonyol wurde von Björn Gebser durchgeführt (GEBSER 2010).

9.4.3 Synthese von Pyrenyldiazomethan (PDAM)

Die Synthese des 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazons erfolgte nach NIMURA *et al.* (1988). 5 g (21,7 mmol) 1-Pyrenicarboxaldehyd wurden mit 3,5 mL (67,9 mmol) Hydrazin-Monohydrat (jeweils Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 80 mL Ethanol suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde

mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch von Petrolether und Diethylether (1:1 v/v) verwendet (1-Pyrenicarboxaldehyd $R_f = 0,55$, 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazon $R_f = 0,33$).

Am Ende der Reaktion wurde der gelbe Niederschlag abfiltriert und mit 50 mL kalten Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Reinheit wurde mittels NMR überprüft ($\geq 90\%$).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO [D_6]): 8,76 (s, 1 H), 8,70 (d, 1 H), 8,40 - 8,01 (m, 8 H), 7,16 (s, 2 H)

Die Oxidation des 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazons erfolgte durch Silber(I)oxid (Ag_2O) nach SCHROEDER und KATZ (1954). Silber(I)oxid wurde vor jeder Synthese nach BUSCH *et al.* (1936) hergestellt. 150 mg (0,61 mmol) des 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazons wurden in 150 mL Diethylether gelöst. Der Lösung wurden 170 mg (0,73 mmol) Ag_2O zugefügt, das mit 1 g Na_2SO_4 vermennt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Glaswolle und Na_2SO_4 filtriert. Das rotbraune Filtrat wurde bei vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Das Produkt wurde unter Lichtausschluss bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Reinheit des Produkts wurde anhand des jeweiligen NMR-Spektrums ermittelt.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO [D_6]): 8,59 - 7,98 (m, 8 H), 7,66 (d, 1 H), 6,87 (s, 1 H)

Es wurden Reinheiten zwischen 15 und 90% erhalten (in den meisten Fällen 25 bis 45%). Proben mit einer Reinheit $\geq 25\%$ wurden für die Derivatisierung verwendet.

9.5 Phytoplankton-Kulturen

9.5.1 Kultivierung

Unialgale, nicht-axenische Kulturen wurden von verschiedenen Kultursammlungen erworben (Tab. 9.4 und Tab. 9.5). Stammkulturen wurden in einem 14:10 Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Beleuchtung erfolgte von oben oder von der Seite über Osram Biolux Lampen (40 bis $80\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, gemessen als photosynthetisch aktive Strahlung PAR). Kultivierungstemperaturen sind für das jeweilige Experiment angegeben.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung in Weck-Gläsern (Sturzglas mit Deckel, je nach Ansatz 350 oder 550 mL), Erlenmeyerkolben (je nach Ansatz 250 bis 2000 mL) oder sterilen Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss (50 mL oder 250 mL, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Weck-Gläser wurden vor Gebrauch für mindestens 8 Stunden auf $250\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Erlenmeyerkolben wurden mit Alufolie verschlossen und autoklaviert ($121\text{ }^\circ\text{C}$, 20 Minuten). Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

9.5.2 Medien

Alle Medien wurde vor der Verwendung autoklaviert (121 °C, 30 Minuten, jeweils 1 L in Nalgene® Polypropylen-Flaschen).

Für die Kultivierung von *Emiliana huxleyi* wurden 33,3 g hw-Meersalz® professional (bezogen von aquaristik.net, Babenhausen, Deutschland) und 400 µL Seramis® für Grünpflanzen (MARS GmbH, Mogendorf, Deutschland) in 1 L bidestilliertem Wasser bzw. in MicroPure Wasser (MicroPure, TKA, Deutschland) gelöst.

Die Diatomee *Asterionella formosa* wurde im WC-Medium nach MAIER UND CALENBERG (1994) kultiviert. *Microcystis aeruginosa* und *Scenedesmus obliquus* wurden im modifizierten BB-Medium mit Vitaminsatz (3N-BBM+V) gemäß CCAP/SAMS gehalten (AGHAJANIAN 1979).

Für alle weiteren Kulturen wurde künstliches Seewasser nach MAIER UND CALENBERG (1994) verwendet. Der pH-Wert des HEPES-gepufferten Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit 10 mol L⁻¹ Natronlauge auf 7,8 eingestellt. Die Nährstoffkonzentration im Medium betrug 630 µmol L⁻¹ Nitrat, 320 µmol L⁻¹ Silikat und 14,5 µmol L⁻¹ Phosphat.

9.6 Freilanduntersuchungen

9.6.1 Probennahme in der Ostsee

Die Planktonproben aus der Ostsee wurden am 22. August 2010 genommen, Probennahmepunkt war Strande, Leuchtturm Bülk (54,454°N, 10,199°O). Die Probennahme von oberflächennahem Wasser erfolgte in 10 L Plastikkanistern, die in einer Kühlbox nach Jena transportiert wurden.

9.6.2 Probennahme bei Mesokosmos-Studien

Das Mesokosmos-Experiment wurde bei der marinenbiologischen Station Espengrend (Raunefjord, Norwegen, geographische Breite 60,161 °N, geographische Länge 5,138 °O) zwischen dem 14. und 28. April 2008 durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus und der Bestimmung der Zellzahlen findet sich in BAROFSKY *et al.* (2010).

Für die Inokulation wurde eine Kultur der Diatomee *Skeletonema marinoi* verwendet (G4, Universität Bergen, Fachbereich Biologie, isoliert im Raunefjord, Norwegen). Im Laufe des Experiments wurde aus dem Mesokosmos jeden Tag um 7 Uhr eine Probe genommen. Der Mesokosmos wurde mit einer finalen Zelldichte von 1000 Zellen *S. marinoi* pro mL inokuliert.

Darüber hinaus wurden Nährstoffe zugesetzt ($1,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ Phosphat, $18,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ Nitrat, $11,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ Silikat).

Die Probennahme der Mesokosmos- und Feldproben erfolgte mit 5 L Plastikkanistern. Die Proben wurden unmittelbar in das Labor gebracht und bis zur Filtration in einer Kühlkammer aufbewahrt.

9.7 Probenvorbereitung

9.7.1 Filtration

Die Filtration der Phytoplankton-Kulturen erfolgte über Whatman GF/C Filter. Bei Volumina unter 200 mL erfolgte die Filtration mittels Schwerkraft. Bei höheren Volumina wurde bei vermindertem Druck filtriert. Der Filter mit den Zellen wurde, abhängig von der erwarteten DMSP-Konzentration, in 1 bis 2 mL Methanol überführt, das $100 \mu\text{L}$ einer wässrigen $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ D₆-DMSP-Lösung enthielt. Die Lagerung der Methanol-Extrakte erfolgte bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Für die Ostseeproben wurden 30 und 100 mL mittels Schwerkraft, 1000, 3000 und 5000 mL bei vermindertem Druck filtriert. Die Filter wurden in 1,5 mL Methanol überführt, das $100 \mu\text{L}$ einer wässrigen $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ D₆-DMSP-Lösung enthielt.

Für die Mesokosmos-Proben wurden 1000 bis 5000 mL bei vermindertem Druck filtriert. Die Filter wurden in 4 mL Methanol überführt, das $100 \mu\text{L}$ einer wässrigen $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ D₆-DMSP Lösung enthielt. Lagerung und Transport der methanolischen Zellextrakte erfolgten bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.7.2 Derivatisierung

$100 \mu\text{L}$ Algenextrakt (in Methanol) wurden mit $80 \mu\text{L}$ einer PDAM-Lösung versetzt ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ in Tetrahydrofuran). Die Reaktionsmischung wurde 5 Minuten geschüttelt (Vortexer). Die Zugabe mit anschließendem Schütteln wurde insgesamt fünfmal mit jeweils $80 \mu\text{L}$ Lösung durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 100 bis $350 \mu\text{L}$ Wasser/Methanol/Tetrahydrofuran (60:20:20 v/v/v) mit 0,1 Vol.-% Ameisensäure aufgenommen (Volumen abhängig von erwarteter DMSP-Konzentration). Die Proben wurden anschließend 5 Minuten geschüttelt (Vortexer) und zentrifugiert (5 Minuten, 16.000 g). Der Überstand wurde für die UPLC/MS-Analyse verwendet. Die Probenlagerung erfolgte bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

PDAM weist in Lösung eine geringe Stabilität auf (NIMURA *et al.* 1988). Aus diesem Grund wurde die PDAM-Lösung unmittelbar vor der Derivatisierung angesetzt.

Im Fall der Mesokosmos-Proben wurden 3 mL des Zellextraktes im Stickstoffstrom auf 50 μ L reduziert und anschließend wie oben beschrieben derivatisiert.

9.7.3 HILIC

100 μ L Algenextrakt (in Methanol) wurden abhängig von der erwarteten DMSP-Konzentration mit 400 bis 900 μ L Acetonitril/Wasser (9:1 v/v) verdünnt. Die Lösung wurde zentrifugiert (5 Minuten, 16.000 g) und der Überstand für die UPLC/MS-Analyse verwendet. Aufgrund der geringen Probenstabilität wurde die Verdünnung unmittelbar vor der Messung durchgeführt. Standardlösungen wurden in Acetonitril/Wasser (9:1 v/v) hergestellt. Zu 1 mL Standardlösung wurden 40 μ L Seewasser zugefügt und die Probe wurde zentrifugiert (5 Minuten, 16.000 g).

9.7.4 ZIC-HILIC

100 μ L Algenextrakt (in Methanol) wurden abhängig von der erwarteten DMSP-Konzentration mit 200 bis 900 μ L Acetonitril/Wasser (9:1 v/v) verdünnt. Die Lösung wurde zentrifugiert (5 Minuten, 16.000 g) und der Überstand für die UPLC/MS-Analyse verwendet. Aufgrund der geringen Probenstabilität wurde die Verdünnung unmittelbar vor der Messung durchgeführt. Standardlösungen wurden in Acetonitril/Wasser (9:1 v/v) angesetzt.

9.7.5 Anreicherung von DMSP mittels ZIC-HILIC-SPE

10 mL künstliches Seewasser (MAIER und CALENBERG 1994) wurden mit DMSP und D₆-DMSP versetzt (Endkonzentration 5 bis 100 nmol L⁻¹). Der Probe wurden in einem 50 mL Falcon®-Zentrifugenröhrchen 35 mL Acetonitril und 5 mL Methanol zugefügt. Der Zusatz von Methanol ist notwendig, um eine Phasentrennung zu verhindern. Die Probe wurde zentrifugiert (3 min, 1000 g) und der Überstand quantitativ für die Festphasenextraktion verwendet.

Eine ZIC®-HILIC-SPE-Kartusche (200 mg, 3 mL; di2chrom, Marl, Deutschland) wurde mit 3 mL Wasser gewaschen und mit 3 mL Acetonitril konditioniert. Die Probenaufgabe wurde manuell durchgeführt, der Durchlauf erfolgte allein über die Schwerkraft.

Nach vollständigem Probendurchlauf wurde verbleibende Probenlösung durch Anlegen von Druck aus der Kartusche entfernt. Anschließend erfolgte die Elution mit zweimal 400 μ L Wasser mit 2 Vol.-% Acetonitril und 0,05 Vol.-% Ameisensäure. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert. Vor der Messung wurden 100 μ L des Eluats mit 100 μ L Acetonitril verdünnt.

Um den Einfluss des Acetonitril-Anteils auf die Anreicherung von DMSP zu testen, wurden folgende Ansätze durchgeführt: *i*) 10 mL Seewasser, 35 mL Acetonitril, 5 mL Methanol (80% organisches Lösungsmittel); *ii*) 15 mL Seewasser, 31 mL Acetonitril, 4 mL Methanol (70%); *iii*) 20 mL Seewasser, 27 mL Acetonitril, 3 mL Methanol (60%). Dabei wurde im Seewasser eine DMSP-Konzentration von 20 und 50 nmol L⁻¹ getestet.

9.7.6 Indirekte Bestimmung über DMS

100 µL Algenextrakt (in Methanol) wurden in ein 4 mL Glasvial gegeben und mit 400 µL Natronlauge (1 mol L⁻¹) versetzt. Das Vial wurde sofort mit Schraubkappe verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Gasraum des Vials für 10 Minuten mittels SPME extrahiert (Fasermaterial: Divinylbenzen/ Carboxen/ Polydimethylsiloxan, Supelco, Deutschland) (NIKI *et al.* 2004, YASSAA *et al.* 2006).

9.8 Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich wurden verschiedene Phytoplankton-Kulturen in der exponentiellen Phase 1:5 verdünnt (Kultivierungstemperatur siehe Tab. 9.4). Nach einer Wachstumszeit von 2 bis 7 Tagen (Erreichen der mittleren exponentiellen Phase) wurden die Proben filtriert (9.7.1). Die Probennahme erfolgte 5 bis 7 Stunden nach Beginn der Lichtperiode. Es wurde jeweils eine Phytoplankton-Kultur pro Stamm verwendet.

Tab. 9.4: Phytoplankton-Kulturen, Filtrationsvolumen und Kultivierungstemperaturen für Methodenvergleich

Art (Stamm)	Zellen mL ⁻¹ (Filtrationsvolumen)	Kultivierungstemperatur
<i>Emiliana huxleyi</i> (RCC 1216)	245.000 (128 mL)	18 °C
<i>Emiliana huxleyi</i> (RCC 1217)	600.000 (124 mL)	18 °C
<i>Emiliana huxleyi</i> (CCMP 1516)	425.000 (130 mL)	18 °C
<i>Prorocentrum minimum</i>	15.000 (60 mL)	21 °C
<i>Skeletonema costatum</i> (RCC 75)	640.000 (106 mL)	15 °C
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCMP 1335)	1.200.000 (157 mL)	15 °C
<i>Thalassiosira weissflogii</i> (RCC 76)	89.000 (515 mL)	18 °C
<i>Asterionella formosa</i> (SAG 8.95)	150.000 (480 mL)	18 °C
<i>Microcystis aeruginosa</i> (SAG 18.85)	545.000 (700 mL)	18 °C
<i>Scenedesmus obliquus</i> (SAG 276-3a)	4.510.000 (700 mL)	18 °C

Die Zellzählung wurde in Abhängigkeit von der Dichte mit Hilfe eines Fuchs-Rosenthal oder Neubauer (improved) Häemocytometers durchgeführt. Es wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet (DM2000, Leica, Heerbrugg, Schweiz).

Von jedem Methanol-Extrakt wurden vier Aliquote á 100 µL derivatisiert (9.7.2) und anschließend analysiert (9.3.1). Weitere vier Aliquote á 100 µL des gleichen Extraktes wurden für die indirekte Bestimmung via DMS verwendet (9.7.6 und 9.3.4).

9.9 DMSP- und GBT-Analytik

Die Kultivierung erfolgte bei 13 °C (Ausnahme *Prorocentrum minimum*, 21 °C). Die Kulturen wurden in der exponentiellen Phase 1:5 verdünnt und zwei bis sieben Tage im Wachstum gehalten (abhängig von Zellteilungsrate). Danach wurde das Verfahren (Verdünnung 1:5 mit anschließendem Wachstum) dreimal wiederholt. Anschließend wurde die jeweilige Kultur in drei Aliquote aufgeteilt und für weitere zwei bis vier Tage kultiviert. Damit wurden drei biologische Replikate eines Stammes erhalten, die parallel weiter verarbeitet wurden.

Kulturen ohne Angabe eines Stammes wurden aus der vorhandenen Labordatenbank bezogen.

Tab. 9.5: Phytoplankton-Kulturen und Filtrationsvolumen für DMSP- und GBT-Analytik

Art (Stamm)	Zellen mL ⁻¹ (Filtrationsvolumen)
<i>Amphiphrota paludosa</i>	46.000 (98 mL)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	706.000 (106 mL)
<i>Navicula</i> sp.	1.140.000 (97 mL)
<i>Pavlova lutheri</i>	986.000 (110 mL)
<i>Rhodomonas</i> sp.	119.000 (100 mL)
<i>Thalassiosira weissflogii</i> (RCC76)	65.000 (102 mL)
<i>Chaetoceros didymus</i>	136.000 (93 mL)
<i>Prymnesium parvum</i>	137.000 (93 mL)
<i>Skeletonema costatum</i> (RCC75)	1.276.000 (107 mL)
<i>Skeletonema marinoi</i> (G4)	561.000 (114 mL)
<i>Cryptochloris</i> sp.	258.000 (103 mL)
<i>Isochrysis galbana</i>	732.000 (100 mL)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (UTEX646)	1.307.000 (102 mL)
<i>Prorocentrum minimum</i>	2.000 (79 mL)
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCMP1335)	786.000 (103 mL)

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand von fixierten Proben (Lugol-Lösung, RODHE *et al.* 1958) wie in 9.8 beschrieben. Die Analyse von DMSP und GBT erfolgte nach Derivatisierung (9.7.2) mittels UPLC/MS (9.3.1).

9.10 DMSP-Gehalt im Verlauf einer Zellkultur

9.10.1 Kultivierung

Es wurde eine Kultur der Diatomee *Skeletonema marinoi* verwendet (G4). Die Kultivierung erfolgte in künstlichem Seewasser (MAIER UND CALENBERG 1994) bei 15 °C und einem Licht:Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden (Lichtzufuhr von 6 bis 20 Uhr). Das Licht wurde dabei von der Seite zugeführt (Osram biolux T8 36W 840, $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gemessen als PAR).

Die für das Experiment notwendigen 11 Liter Kulturen wurden aus einer Stammkultur gewonnen. Hierfür wurden 75 mL einer Kultur (exponentielle Wachstumsphase, ca. $950.000 \text{ Zellen mL}^{-1}$) mit künstlichem Seewasser auf 600 mL aufgefüllt. Nach 2 Tagen wurde diese Kultur geteilt und jeweils 300 mL wurden in 1,5 Liter Nitrat-reiches ($630 \mu\text{mol L}^{-1}$) und Nitrat-armes Medium (ca. $63 \mu\text{mol L}^{-1}$) überführt. Nach 3 Tagen wurde jede Kultur in drei Aliquote (500 mL) geteilt. Diese wurden für die Inokulation von 10,5 L künstlichem Seewasser in Polycarbonat-Flaschen (10 L, Nalgene®, bezogen über VWR, Dresden, Deutschland) verwendet, so dass eine Zelldichte von $25.000 \text{ Zellen mL}^{-1}$ erreicht wurde.

Die Kulturen wurden kontinuierlich mit steriler Luft belüftet (HEPA-Vent Filter, \varnothing 50 mm, Whatman, Belüftung mittels Aquariumpumpe Hagen Elite 802). Die Probennahme erfolgte über eine von VIDOUDEZ (2010) beschriebene „dripping chamber“ (Verbindung zwischen einer 2,5 und 1 mL Spritze, Aufbau ermöglichte kontaminationsfreie Probennahme). Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus ist in VIDOUDEZ (2010) aufgeführt.

9.10.2 Probennahme

Die Inokulation erfolgte am Tag 0 zwischen 9 und 10 Uhr. Ab Tag 1 wurde um 6, 10, 14, 18 und 22 Uhr die Probennahme durchgeführt. Die Probennahme um 6 Uhr erfolgte wenige Minuten vor Beginn der Lichtperiode. Am Tag 2, Tag 4 und Tag 6 wurde zusätzlich um 1 Uhr eine Probe genommen. Ab Tag 9 (bzw. für zwei Kulturen mit verzögertem Wachstum ab Tag 10) erfolgte die Probennahme lediglich um 14 Uhr (Filtration siehe 9.7.1).

Die Analyse des partikulären DMSP erfolgte nach Derivatisierung mit PDAM (9.7.2 und 9.3.1).

9.10.3 Zellzählung und Volumenbestimmung

Sowohl die Zellzählung als auch die Volumenbestimmung erfolgte anhand unfixierter Proben (siehe 9.8). Fotos für die Zellvolumen-Bestimmung wurden mit einem Leica DFC280 System aufgenommen, die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Leica IM50 (Version 4.0). Pro Probennahme wurden 10 bis 20 Zellen vermessen. Für die Volumenberechnung wurde die geometrische Form eines Zylinders angenommen (MONTAGNES und FRANKLIN 2001).

9.10.4 *In vivo* Fluoreszenz und Nährstoffanalytik

Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenz erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Leser. Für die Messungen wurden schwarze Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Für jede Kulturflasche wurden 6 Felder mit jeweils 300 µL Kultur befüllt. Als Anregungs- und Emissionswellenlänge wurden 430 und 665 nm gewählt (Lampenenergie 11000 V, scan-Zeit 0,1 Sekunden).

Für die Nährstoffanalytik wurden 10 bis 15 mL Filtrat in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und nach Zusatz von 20 µL Dichlormethan bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte photometrisch (Silikat, Phosphat, Nitrit: PARSONS *et al.* 1984, Nitrat: ZHANG UND FISCHER 2006; Volumina auf Probengröße von 0,5 bis 1 mL angepasst).

9.10.5 DMSP-Produktionsrate

Die DMSP-Produktionsrate wurde sowohl für die Licht- (6 Uhr bis 18 Uhr) als auch für die Dunkelperiode berechnet (22 Uhr bis 6 Uhr des folgenden Tages). Datenpunkte von Tag 2, 6 Uhr bis Tag 6, 18 Uhr wurden für die Berechnung der exponentiellen Phase verwendet (Tag 7, 18 Uhr für zwei der N+ Kulturen). Für die stationäre Phase wurden die ersten zwei Tage berücksichtigt (Tag 6, 22 Uhr bis Tag 8, 14 Uhr bzw. Tag 7, 22 Uhr bis Tag 9, 14 Uhr). Die Werte wurden auf die mittlere Zellzahl in dem jeweiligen Zeitraum bezogen und nach folgender Formel berechnet (Δt in Stunden):

$$\text{DMSP-Produktionsrate} = \frac{[\text{DMSPp}(t_2)] - [\text{DMSPp}(t_1)]}{\Delta t \cdot \frac{(\text{Zellzahl}(t_2) + \text{Zellzahl}(t_1))}{2}}$$

9.10.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot 11.0. Bei Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der t-Test angewendet. Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, wenn die Datensätze nicht die Voraussetzungen der Normalverteilung und/oder Varianzenhomogenität erfüllten. Der Vergleich mehrerer Mittelwerte wurde anhand einer one way ANOVA durchgeführt. Wurde der zeitliche Verlauf des DMSP-Zellgehaltes untersucht, wurde eine one way repeated measures ANOVA mit Bonferroni Post Hoc Test angewendet. Der Vergleich der direkten und indirekten DMSP-Bestimmung im zeitlichen Verlauf der Kultur wurde anhand einer two way repeated measures ANOVA mit Tukey Post Hoc Test vorgenommen. Wenn bei einem Vergleich mehrerer Mittelwerte die Datensätze nicht die Voraussetzungen der Normalverteilung und Varianzenhomogenität erfüllten, wurde eine ANOVA on ranks mit Dunn Post Hoc Test durchgeführt.

9.11 Aufnahme von DMSP

9.11.1 Aufnahme in verschiedenen Phytoplankton-Kulturen

Kulturen der Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335), *Thalassiosira weissflogii* (RCC 76) und *Skeletonema costatum* (RCC 75), des Coccolithophoriden *Emiliana huxleyi* (RCC 1216 und RCC 1242) sowie des Dinoflagellaten *Prorocentrum minimum* wurden bei 14 °C (Diatomeen) bzw. 18 °C gehalten. Zu 40 mL der entsprechenden Kultur wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 100 µL einer 50 µmol L⁻¹ ¹³C₂D₆-DMSP-Lösung (in Wasser) gegeben. Die Kulturen befanden sich zu Beginn der Zugabe in der exponentiellen Wachstumsphase. Kulturen mit hoher Zellteilungsrate gingen im Verlauf des Experiments in die stationäre Phase über. Die Kulturen wurden anschließend filtriert (9.7.1), wobei die Zellen auf dem Filter mit 20 mL Medium gewaschen wurden. Der Filter wurde in Methanol überführt, das keinen internen Standard enthielt.

Parallel zu der jeweiligen Kultur mit ¹³C₂D₆-DMSP-Zusatz wurde eine Kontrollkultur kultiviert und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Messungen erfolgten mit der ZIC-HILIC-Methode (9.3.3).

9.11.2 Kinetik

Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Björn Gebser durchgeführt.

Für die Untersuchung der Kinetik wurden Kulturen von *T. weissflogii* (RCC 76) und *E. huxleyi* (RCC 1242) verwendet. Zu 100 mL der Kultur wurden zum Zeitpunkt t = 0 Minuten 100 µL

einer 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ -DMSP-Lösung gegeben. Nach 2,5 , 5, 7,5 , 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurden 5 mL Probe aus der Kultur entfernt und bei vermindertem Druck filtriert. Der Filter wurde dreimal mit jeweils 2 mL Medium gewaschen und anschließend in Methanol überführt. Als interner Standard für die Quantifizierung diente Gonyol (100 μL einer wässrigen 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Lösung). Die Messungen erfolgten mit der ZIC-HILIC-Methode (9.3.3).

9.12 Einfluss des Klimawandels

9.12.1 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in einem Licht:Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden (6 bis 20 Uhr), das Licht wurde von oben zugeführt (Osram biolux T8 36W 840, 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und Osram lumilux L 15W 840, 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gemessen als PAR). Es wurde ein Kulturansatz von 400 mL verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 500 mL Duran® Flaschen. Der für die 11 Liter Kulturen beschriebene Versuchsaufbau wurde auf die 400 mL Kulturen übertragen.

Die Kontrollkulturen wurden bei einer Temperatur von 14,5 °C gehalten. Die sterile Belüftung (HEPA-Vent Filter, Ø 50 mm, Whatman) erfolgte über eine Aquariumpumpe (Hagen Elite 802). Behandelte Kulturen (C+, T+, TC+) wurden im Thermoschrank bei 14,5 °C oder 20,5 °C gehalten (BEG Thermoschrank professionell, BEG Schulze Bremer GmbH, Dülmen-Rorup, Deutschland). Die sterile Belüftung erfolgte abhängig von der Behandlung über eine Aquariumpumpe oder mit Hilfe von synthetischer Luft mit 790 ppm CO_2 (Linde, Leuna, Deutschland). Sowohl die Kulturen der Kontrolle als auch der Behandlungen wurden als Dreifachbestimmung angesetzt.

Für jede Behandlung wurden die Kulturen in der exponentiellen Phase mehrmals verdünnt (Verdünnungsfaktor abhängig von der Zellteilungsrate) und angezogen, so dass mindestens sieben Generationen der Kultur den jeweiligen Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren. Die Berechnung der Generationenzahl wurde nach folgender Formel vorgenommen:

$$\text{Anzahl der Generationen} = \log_2 \left(\frac{\text{Zellzahl } (t_2)}{\text{Zellzahl } (t_1)} \right)$$

Das für die Verdünnung verwendete Medium wurde ebenfalls steril belüftet (Aquariumpumpe oder synthetische Luft mit 790 ppm CO_2), um die Kulturen keinem permanenten Wechsel zwischen einer hohen und einer niedrigen CO_2 -Konzentration im Medium auszusetzen. Dies war vor allem im Hinblick auf die CO_2 -Behandlungen von Bedeutung.

9.12.2 Versuchsdesign

Kulturen der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335) wurden ausgehend von 14,5 °C in Schritten von 2 °C auf eine Temperatur von 20,5 °C gebracht (Abb. 9.2 A). Für jede Temperaturstufe wurde die Kultur in der exponentiellen Phase mehrmals verdünnt (Verdünnungsfaktor abhängig von der Zellteilungsrate), so dass mindestens sieben Generationen der Kultur den jeweiligen Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren (Abb. 9.2 B). Es sollte so eine Akklimatisierung an die neuen Bedingungen gewährleistet werden. Am Ende der Akklimatisierungsphase wurde eine Probe der jeweiligen Kultur filtriert (9.7.1) und hinsichtlich DMSP und GBT analysiert (ZIC-HILIC-Methode, 9.7.3).

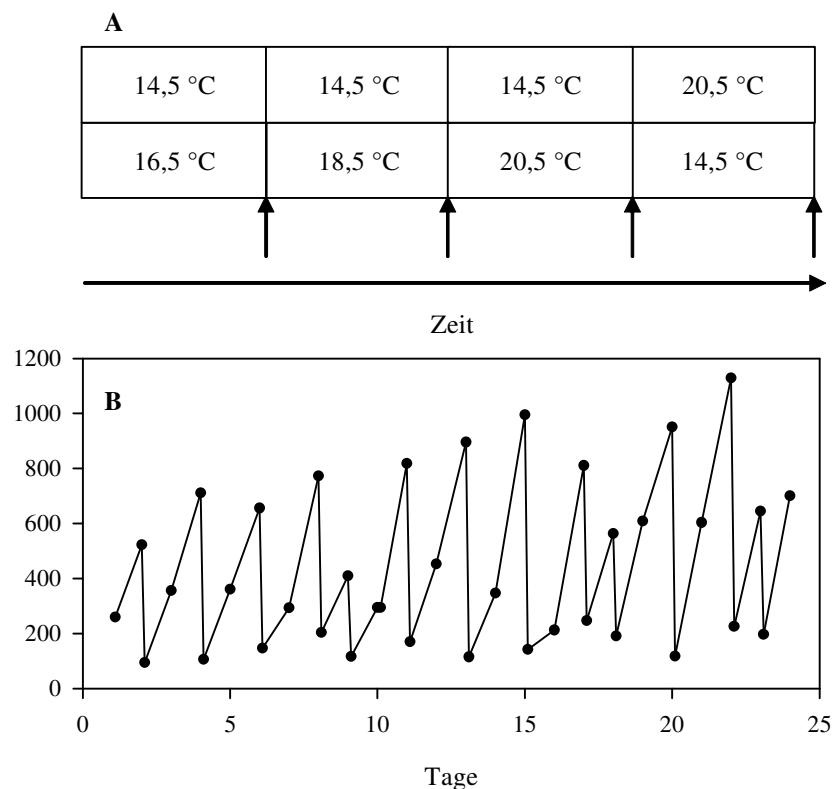


Abb. 9.2: (A) Versuchsdesign für Vorstudien mit *T. pseudonana* (Einfluss schrittweise Akklimatisierung); Pfeile markieren Probennahmepunkte; (B) Beispiel für Verlauf der Zellzahl im Rahmen dieser Studie.

Im Anschluss an die Probennahme bei 20,5 °C wurden die Kontrollkulturen (14,5 °C) und behandelte Kulturen (20,5 °C) auf das jeweils andere Temperaturniveau versetzt. Die Zellen waren somit ohne vorherige Heranführung einem Temperaturunterschied von 6 °C ausgesetzt. Nach einer weiteren Akklimatisierung (> 7 Generationen) wurde erneut eine Probe für die DMSP- und GBT-Analytik genommen.

9.12.3 Einfluss von Klimaveränderungen

Es wurden Kulturen der Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335) und *Phaeodactylum tricornutum* (CCMP 2561) und des Coccolithophoriden *Emiliana huxleyi* verwendet (RCC 1242, nicht kalzifizierend und RCC 1731, kalzifizierend) (Details zum Medium siehe 9.5.2).

Folgende Behandlungen wurden durchgeführt: Kultivierung bei 20,5 °C und Belüftung mit Aquariumpumpe (T+), Kultivierung bei 20,5 °C und Belüftung mit synthetischer Luft mit 790 ppm CO₂ (TC+), Kultivierung bei 14,5 °C und Belüftung mit synthetischer Luft mit 790 ppm CO₂ (C+). Die Kontrollen (K1 und K2) wurden bei 14,5 °C gehalten, die Belüftung erfolgte über eine Aquariumpumpe.

Es erfolgte keine langsame Gewöhnung an die jeweiligen Bedingungen, sondern ein sofortiger Wechsel der Kultivierungsbedingungen nach der Inokulation.

Für alle Kulturen wurden zunächst die T+ und TC+ Behandlungen durchgeführt. Parallel wurde die Kontrolle K1 kultiviert. Nach erfolgter Probennahme wurden die K1 Kulturen in sechs Aliquote aufgeteilt und verdünnt. Drei dienten im weiteren Verlauf als Kontrolle K2, drei wurden für die C+ Behandlungen verwendet. Eine gleichzeitige Durchführung der T+, TC+ und C+ Behandlungen war aus logistischen Gründen nicht möglich.

9.12.4 Probennahme

Die Inokulation erfolgte für jede Behandlung zwischen 8 und 9 Uhr. Täglich wurde eine Probe um 13 Uhr für die Zellzählung und *in vivo* Fluoreszenz-Messung genommen. Die Probenahme für die DMSP- und GBT-Analytik und Zellvolumenbestimmung erfolgte um 12 Uhr (Filtration siehe 9.7.1).

9.12.5 Zellteilungsrate, Volumenbestimmung und pH-Wert

Detaillierte Angaben zur Zellzählung und Volumenbestimmung sind bereits in 9.10.3 zusammengefasst. Die Berechnung der Zellteilungsrate μ erfolgte nach folgender Formel:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{\text{Zellzahl } (t_2)}{\text{Zellzahl } (t_1)} \right)}{t_2 - t_1}$$

Für die Volumenberechnung von *E. huxleyi* wurde die geometrische Form einer Kugel angenommen. Für *P. tricornutum* wurde die Annäherung nach MONTAGNES und FRANKLIN (2001) verwendet. Dabei wird die Zelle als zwei zusammengesetzte Kegel betrachtet. Das Ergebnis wird noch mit einem Korrekturfaktor von 1,5 multipliziert. Für *T. pseudonana* konnte aufgrund der geringen Zellgröße keine Volumenbestimmung vorgenommen werden.

Für die pH-Wert Messung wurden 25 mL Kultur über Whatman GF/C-Filter filtriert. Das Filtrat wurde direkt für die pH-Wert Messung verwendet.

9.12.6 *In vivo* Fluoreszenz

Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenz erfolgte wie in 9.10.4 beschrieben. Für jede Kultur wurden 3 Felder mit jeweils 300 μ L Kultur befüllt.

9.12.7 Elektronenmikroskop-Aufnahmen

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Coccolithen wurden Kulturen von *E. huxleyi* (RCC1731) über Mischcellulose-Filter filtriert (Millipore, 0,8 μ m) und anschließend 6 Stunden bei 60 °C getrocknet (in Anlehnung an DE BODT *et al.* 2010).

Die getrockneten Proben wurden mit ca. 20 nm Gold besputtert und am Elektronenmikroskopischen Zentrum der FSU Jena analysiert.

9.12.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot 11.0. Bei Vergleich von zwei bzw. mehreren Mittelwerten wurde der t-Test bzw. die ANOVA angewendet. Wenn die Datensätze nicht die Voraussetzungen der Normalverteilung und/oder Varianzenhomogenität erfüllten, wurde der Mann-Whitney-Test bzw. die ANOVA on Ranks verwendet. Weitere Details sind in den in den jeweiligen Tabellen und Abbildungen angegeben.

Die Kulturen der jeweiligen Behandlungen wurden als Triplikate angesetzt. Jede Probe für die DMSP- und GBT-Analytik wurde dreimal injiziert. Dadurch ergibt sich für jede Behandlung eine Datenpunktzahl von $n = 9$.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aghajanian JG: A starch grain-mitochondrion-dictyosome association in *Batrachospermum* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **1979**, *15*, 230-232.
- Alpert AJ: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177-196.
- Andreae MO: The ocean as a source of atmosphere sulphur compounds. In Buat-Menard P [Ed.] *The Role of Air-Sea Exchange in Geochemical Cycling*. **1986**, Reidel, Dordrecht, NL, 331-362.
- Anning T, Harris G, Geider RJ: Thermal acclimation in the marine diatom *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* **2001**, *36*, 233-241.
- Appelblad P, Jonsson T [Ed.], Pontén E, Viklund C, Jiang W: A practical guide to HILIC. **2008**, Merck SeQuant AB, Umeå, Schweden.
- Archer SD, Ragni M, Webster R, Airs RL, Geider RJ: Dimethyl sulfoniopropionate and dimethyl sulphide production in response to photoinhibition in *Emiliana huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* **2010**, *55*, 1579-1589.
- Atkinson D: Temperature and organism size – a biological law for ectotherms. *Adv. Ecol. Res.* **1994**, *25*, 1-58.
- Atkinson D, Ciotti BJ, Montagnes DJS: Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Proc. R. Soc. Lond. B* **2003**, *270*, 2605-2611.
- Balch WM, Holligan PM, Kilpatrick KA: Calcification, photosynthesis and growth of the bloom-forming coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Cont. Shelf Res.* **1992**, *12*, 1353-1374.
- Barofsky A, Vidoudez C, Pohnert G: Metabolic profiling reveals growth stage variability in diatom exudates. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **2009**, *7*, 382-390.
- Barofsky A, Simonelli P, Vidoudez C, Troedsson C, Nejstgaard, JC, Jakobsen HH, Pohnert G: Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp. *J. Plank. Res.* **2010**, *32*, 263-272.
- Bates TS, Charlson RJ, Gammon RH: Evidence for the climatic role of marine biogenic sulphur. *Nature* **1987**, *329*, 319-321.
- Beardall J, Stojkovic S, Larsen S: Living in a high CO₂ world: Impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecol Div.* **2009**, *2*, 191-205.
- Beaugrand G, Reid PC: Long-term changes in phytoplankton, zooplankton and salmon related to climate. *Global Change Biol.* **2003**, *9*, 801-817.
- Berdalet E, Latasa M, Estrada M: Effect of nitrogen or phosphorus starvation on nucleic acid and protein content of *Heterocapsa* sp. *J. Plank. Res.* **1994**, *16*, 303-316.

- Berges JA, Varela DE, Harrison PJ: Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2002**, 225, 139-146.
- Bopp L, Aumont O, Belviso S, Monfray P: Potential impact of climate change on marine dimethyl sulfide emissions. *Tellus B* **2003**, 55, 11-22.
- Boyce DG, Lewis MR, Worm B: Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* **2010**, 466, 591-596.
- Bucciarelli E, Sunda WG: Influence of CO₂, nitrate, phosphate, and silicate limitation on intracellular dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.* **2003**, 48, 2256-2265.
- Bucciarelli E, Sunda WG, Belviso S, Sarthou G: Effect of the diel cycle on production of dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of *Emiliania huxleyi*. *Aquat. Microb. Ecol.* **2007**, 48, 73-81.
- Burkhardt S, Riebesell U, Zondervan I: Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size in the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1999**, 63, 3729-3741.
- Burkhardt S, Amoroso G, Riebesell U, Sültemeyer D: CO₂ and HCO₃⁻ uptake in marine diatoms acclimated to different CO₂ concentrations. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, 46, 1378-1391.
- Busch KGA, Clark JW, Genung LB, Schroeder EF, Evans WL: The mechanism of carbohydrate oxidation. XVIII. The oxidation of certain sugars with silver oxide in the presence of potassium hydroxide. *J. Org. Chem.* **1936**, 1, 1-16.
- Capon RJ, Vuong D, Lacey E, Gill JH: (-)-Echinobetaine A: Isolation, structure elucidation, synthesis, and SAR studies on a new nematocide from a southern Australian marine sponge, *Echinodictyum* sp. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 179-182.
- Chambers ST, Kunin CM, Miller D, Hamada A: Dimethylthetin can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 4845-4847.
- Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae MO, Warren SG: Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* **1987**, 326, 655-661.
- Chassot E, Bonhommeau S, Dulvy NK, Mélin F, Watson R, Gascuel D, Le Pape O: Global marine primary production constrains fisheries catches. *Ecol. Lett.* **2010**, 13, 495-505.
- Collos Y: Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 2. Changes in nitrate and nitrite following a nitrate perturbation. *Limnol. Oceanogr.* **1982a**, 27, 528-535.
- Collos Y: Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. III. Short-term uncoupling of nitrate uptake and reduction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1982b**, 62, 285-295.
- Collos Y: Nitrate uptake, nitrite release and uptake, and new production estimates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, 171, 293-301.

Colmer TD, Corradini F, Cawthray GR, Otte ML: Analysis of dimethylsulphoniopropionate (DMSP), betaines and other organic solutes in plant tissue extracts using HPLC. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 163-168.

Costanza R, d'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P, van den Belt: The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **1997**, *387*, 253-260.

Dacey JWH, Blough NV: Hydroxide decomposition of dimethylsulfonylpropionate to form dimethylsulfide. *Geophys. Res. Lett.* **1987**, *14*, 1246-1249.

De Bodt C, van Oostende N, Harlay J, Sabbe K, Chou L: Individual and interacting effects of pCO₂ and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification: Study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. *Biogeosciences* **2010**, *7*, 1401-1412.

DeBose JL, Lema SC, Nevitt GA: Dimethylsulfonylpropionate as a foraging cue for reef fishes. *Science* **2008**, *319*, 1356.

Dickschat JS, Zell C, Brock NL: Pathways and substrate specificity of DMSP catabolism in marine bacteria of the *Roseobacter* clade. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 417-425.

Dickson DMJ, Kirst GO: The role of β-dimethylsulphonylpropionate, glycine betaine and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*. *Planta* **1986**, *167*, 536-543.

Dickson DMJ, Kirst GO: Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae: The role of inorganic ions, quaternary ammonium, tertiary sulphonium and carbohydrates solutes. I. Diatoms and a rhodophyte. *New Phytol.* **1987**, *106*, 645-655.

Dortch Q, Clayton Jr. JR, Thoresen SS, Ahmed SI: Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.* **1984**, *81*, 237-250.

van Duyl FC, Gieskes WWC, Kop AJ, Lewis WE: Biological control of short-term variations in the concentration of DMSP and DMS during a *Phaeocystis* spring bloom. *J. Sea Res.* **1998**, *40*, 221-231.

El-Sabaawi R, Harrison PJ: Interactive effects of irradiance and temperature on the photosynthetic physiology of the pennate diatom *Pseudo-Nitzschia granii* (Bacillariophyceae) from the Northeast subarctic Pacific. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 778-785.

Engel A, Zondervan I, Aerts K, Beaufort L, Benthien A, Chou L, Delille B, Gattuso J-P, Harlay J, Heemann C, Hoffman L, Jacquet S, Nejtgaard J, Pizay M-D, Rochelle-Newall E, Schneider U, Terbrueggen A, Riebesell U: Testing the direct effect of CO₂ concentration on a bloom of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr.* **2005**, *50*, 493-507.

Eppley RW: Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bulletin* **1972**, *70*, 1063-1085.

Feng Y, Warner ME, Zhang Y, Sun J, Fu F-X, Rose JM, Hutchins DA: Interactive effects of increased pCO₂, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Eur. J. Phycol.* **2008**, *43*, 87-98.

- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P: Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **1998**, *281*, 237-240.
- Fuhrman J: Genome sequences from the sea. *Nature* **2003**, *424*, 1001-1002.
- Gage DA, Rhods D, Nolte KD, Hicks WA, Leustek T, Cooper AJL, Hanson AD: A new route for synthesis of dimethylsulphoniopropionate in marine algae. *Nature* **1997**, *387*, 891-894.
- Gebser B: Schwefelhaltige Osmolyte in Plankton – Synthese, Analytik und Untersuchung von Aufnahmemechanismen. **2010**, Diplomarbeit, Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Geng H, Belas R: Molecular mechanisms underlying roseobacter-phytoplankton symbioses. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 332-338.
- Goldman JC, Mann R: Temperature-influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1980**, *46*, 29-39.
- Gorham J: Separation of plant betaines and their sulphur analogues by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1984**, *287*, 345-351.
- Gröne T, Kirst GO: The effect of nitrogen deficiency, methionine and inhibitors of methionine metabolism on the DMSP contents of *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). *Mar. Biol.* **1992**, *112*, 497-503.
- Harada H, Vila-Costa M, Cebrian J, Kiene RP: Effects of UV radiation and nitrate limitation on the production of biogenic sulfur compounds by marine phytoplankton. *Aquat. Bot.* **2009**, *90*, 37-42.
- Hare CE, Leblanc K, DiTullio GR, Kudela RM, Zhang Y, Lee PA, Riseman S, Hutchins DA: Consequences of increased temperature and CO₂ for phytoplankton community structure in the Bering Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2007**, *352*, 9-17.
- Hardy AC: The Open Sea; Its Natural History. Part II: Fish and Fisheries with Chapters on Whales, Turtles and Animals of the Sea Floor. **1959** Collins, London.
- Hays GC, Richardson AJ, Robinson C: Climate change and marine plankton. *Trends Ecol. Evol.* **2005**, *20*, 337-344.
- Herfort L, Loste E, Meldrum F, Thake B: Structural and physiological effects of calcium and magnesium in *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay and Mohler. *J. Struct. Biol.* **2004**, *148*, 307-314.
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF: The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* **2010**, *328*, 1523-1528.
- Hopkins FE, Turner SM, Nightingale PD, Steinke M, Bakker D, Liss PS: Ocean acidification and marine trace gas emissions. *PNAS* **2010**, *107*, 760-765.

Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA: *Climate Change—2001: The Scientific Basis: contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change*. **2001**, Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. and New York, U.S.A.

Howard AG, Russell DW: Borohydride-coupled HPLC-FPD instrumentation and its use in the determination of dimethylsulfonium compounds. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2882-2887.

Howard AG, Freeman CE, Russell DW, Arbab-Zavar MH, Chamberlain P: Flow injection system with flame photometric detection for the measurement of the dimethylsulfide precursor β -dimethylsulphoniopropionate. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *377*, 95-101.

Hudson RJM, Morel FMM: Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.* **1990**, *35*, 1002-1020.

Hurd CL, Hepburn CD, Currie KI, Raven JA, Hunter KA: Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: Considerations for experimental designs. *J. Phycol.* **2009**, *45*, 1236-1251.

Iglesias-Rodriguez MD, Halloran PR, Rickaby REM, Hall IR, Colmenero-Hidalgo E, Gittins JR, Green DRH, Tyrrell T, Gibbs SJ, von Dassow P, Rehm E, Armbrust EV, Boessenkool KP: Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science* **2008a**, *320*, 336-340.

Iglesias-Rodriguez MD, Buitenhuis ET, Raven JA, Schofield O, Poulton AJ, Gibbs S, Halloran PR, de Baar HJW: Response to comment on "Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world". *Science* **2008b**, *322*, 1466c.

Jolivet Y, Larher F, Hamelin J: Osmoregulation in halophytic higher plants: The protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Lett.* **1982**, *25*, 193-201.

Jørgensen EG: The adaptation of plankton algae. II. Aspects of the temperature adaptation of *Skeletonema costatum*. *Physiol. Plant* **1968**, *21*, 423-427.

Karsten, U, Wiencke C, Kirst GO: Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) accumulation in green macroalgae from polar to temperate regions: Interactive effects of light versus salinity and light versus temperature. *Polar Biol.* **1992**, *12*, 603-607.

Kasamatsu N, Hirano T, Kudoh S, Odate T, Fukuchi M: Dimethylsulfonylpropionate production by psychrophilic diatom isolates. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 874-878.

Keller MD, Bellows WK, Guillard RRL: Dimethyl sulfide production in marine phytoplankton. In Saltzman ES und Cooper WJ [Eds.] *Biogenic Sulfur in the Environment*. **1989**, American Chemical Society, Washington DC, 167-182.

Keller MD, Kiene RP, Matrai PA, Bellows WK: Production of glycine betaine and dimethylsulfonylpropionate in marine phytoplankton. I. Batch cultures. *Mar. Biol.* **1999a**, *135*, 237-248.

- Keller MD, Kiene RP, Matrai PA, Bellows WK: Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. II. N-limited chemostat cultures. *Mar. Biol.* **1999b**, *135*, 249-257.
- Kettle AJ, Andreae MO: Flux of dimethylsulfide from the oceans: A comparison of updated data sets and flux models. *J. Geophys. Res.* **2000**, *105(D22)*, 26793-26808.
- Kiene RP, Hoffmann Williams LP, Walker JE: Seawater microorganisms have a high affinity glycine betaine uptake system which also recognizes dimethylsulfoniopropionate. *Aquat. Microb. Ecol.* **1998**, *15*, 39-51.
- Kiene RP, Linn LJ, Bruton JA: New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *J. Sea Res.* **2000**, *43*, 209-224.
- Kiene RP, Linn LJ: The fate of dissolved dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in seawater: Tracer studies using ³⁵S-DMSP. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 2797-2810.
- Kiene RP, Slezak D: Low dissolved DMSP concentrations in seawater revealed by small-volume gravity filtration and dialysis sampling. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **2006**, *4*, 80-95.
- Kirkwood M, Le Brun NE, Todd JD, Johnston AWB: The *dddP* gene of *Roseovarius nubinhibens* encodes a novel lyase that cleaves dimethylsulfoniopropionate into acrylate plus dimethyl sulfide. *Microbiology* **2010**, *156*, 1900-1906.
- Kirst GO: Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, *40*, 21-53.
- Kirst GO, Thiel C, Wolff J, Nothnagel J, Wanzek M, Ulmke R: Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in ice-algae and its possible biological role. *Mar. Chem.* **1991**, *35*, 381-388.
- Kooistra WHCF, Sarno D, Balzano S, Gu H, Andersen RA, Zingone A: Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist* **2008**, *159*, 177-193.
- Kwint RLJ, Kramer KJM: Annual cycle of the production and fate of DMS and DMSP in a marine coastal system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1996**, *134*, 217-224.
- Latasa M, Berdalet E: Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *J. Plank. Res.* **1994**, *16*, 83-94.
- Lee PA, Rudisill JR, Neeley AR, Maucher JM, Hutchins DA, Feng Y, Hare CE, Leblanc K, Rose JM, Wilhelm SW, Rowe JM, DiTullio GR: Effects of increased pCO₂ and temperature on the North Atlantic spring bloom. III. Dimethylsulfoniopropionate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2009**, *388*, 41-49.
- Leonardos N, Geider RJ: Elevated atmospheric carbon dioxide increases organic carbon fixation by *Emiliania huxleyi* (Haptophyta), under nutrient-limited high-light conditions. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 1196-1203.
- Li WKW, Morris I: Temperature adaptation in *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Photosynthetic rate compensation and capacity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1982**, *58*, 135-150.

- Li C, Hill RW, Jones AD: Determination of betaine metabolites and dimethylsulfoniopropionate in coral tissues using liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry and stable isotope-labeled internal standards. *J. Chrom. B* **2010**, *878*, 1809-1816.
- Link J: Does food web theory work for marine ecosystems? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2002**, *230*, 1-9.
- Litchman E, Neale PJ, Banaszak AT: Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 86-94.
- Litchman E, Klausmeier CA, Yoshiyama K: Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *PNAS* **2009**, *106*, 2665-2670.
- Loáiciga HA: Modern-age buildup of CO₂ and its effects on seawater acidity and salinity. *Geophys. Res. Lett.* **2006**, *33*, L10605.
- Lomas MW, Glibert PM: Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.* **2000**, *36*, 903-913.
- Lundholm N, Hansen PJ, Kotaki Y: Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, *273*, 1-15.
- de Madariaga I, Joint I: A comparative study of phytoplankton physiological indicators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1992**, *158*, 149-165.
- Maier I, Calenberg M: Effect of extracellular Ca²⁺ und Ca²⁺-antagonists on the movement and chemoorientation of male gametes of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Bot. Acta*, **1994**, *107*, 451-460.
- Martinez R: Transient nitrate uptake and assimilation in *Skeletonema costatum* cultures subject to nitrate starvation under low irradiance. *J. Plank. Res.* **1991**, *13*, 499-512.
- Matrai PA, Keller MD: Dimethylsulfide in a large-scale coccolithophore bloom in the Gulf of Maine. *Contin. Shelf Res.* **1993**, *13*, 831-843.
- McNeil BI, Matear RJ: Southern Ocean acidification: A tipping point at 450-ppm atmospheric CO₂. *PNAS* **2008**, *105*, 18860-18864.
- Montagnes DJS, Franklin DJ: Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 2008-2018.
- Nakamura H, Ohtoshi M, Sampei O, Akashi Y, Murai A: Synthesis and absolute configuration of (+)-gonyauline: A modulating substance of bioluminescent circadian rhythm in the unicellular alga *Gonyaulax polyedra*. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2821-2822.
- Nakamura H, Fujimaki K, Sampei O, Murai A: Gonyol: Methionine-induced sulfonium accumulation in a dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8481-8484.
- Nakamura H, Jin T, Funahashi M, Fujimaki K, Sampei O, Murai A, Roenneberg T, Woodland Hastings J: Biogenesis of sulfonium compounds in a dinoflagellate; methionine cascade. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9067-9074.

Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Quéguiner B: Production and dissolution of biogenic silica in the ocean – revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cycles* **1995**, *9*, 359-372.

Niki T, Kunugi M, Otsuki A: DMSP-lyase activity in five marine phytoplankton species: Its potential importance in DMS production. *Mar. Biol.* **2000**, *136*, 759-764.

Niki T, Fujinaga T, Watanabe MF, Kinoshita J: Simple determination of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Oceanogr.* **2004**, *60*, 913-917.

Nimer NA, Brownlee C, Merrett MJ: Carbon dioxide availability, intracellular pH and growth rate of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1994**, *109*, 257-262.

Nimura N, Kinoshita T, Yoshida T, Uetake A, Nakai C: 1-Pyrenyldiazomethane as a fluorescent labelling reagent for liquid chromatographic determination of carboxylic acids. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2067-2070.

Nishiguchi MK, Somero GN: Temperature- and concentration-dependence of compatibility of the organic osmolyte β -dimethylsulfoniopropionate. *Cryobiol.* **1992**, *29*, 118-124.

Okamoto OK, Colepiccolo P: Circadian protection against reactive oxygen species involves changes in daily levels of the manganese- and iron-containing superoxide dismutase isoforms in *Lingulodinium polyedrum*. *Biol. Rhythm Res.* **2001**, *32*, 439-448.

Pachauri RK, Reisinger A [Eds.] *Climate Change 2007: Synthesis Report.* **2007**, Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK.

Pan L, Adams M, Pawliszyn J: Determination of fatty acids using solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4396-4403.

Papageorgiou GC, Murata N: The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosyn. Res.* **1995**, *44*, 243-252.

Parsons TR, Maita Y, Lalli M: A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. **1984**, Pergamon Press, New York, 173 pp.

Patti A, Morrone R, Chillemi R, Piattelli M, Sciuto S: Thetines and betaines of the red alga *Digenea simplex*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 432-435.

Pichereau V, Pocard J-A, Hamelin J, Blanco C, Bernard T: Differential effects of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and other S-methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1420-1429.

Prince EK, Myers TL, Kubanek J: Effects of harmful algal blooms on competitors: Allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Limnol. Oceanogr.* **2008**, *53*, 531-541.

Reppe and others: Äthinylierung VI. *J. Org. Chem.*, **1955**, *596*, 158-224.

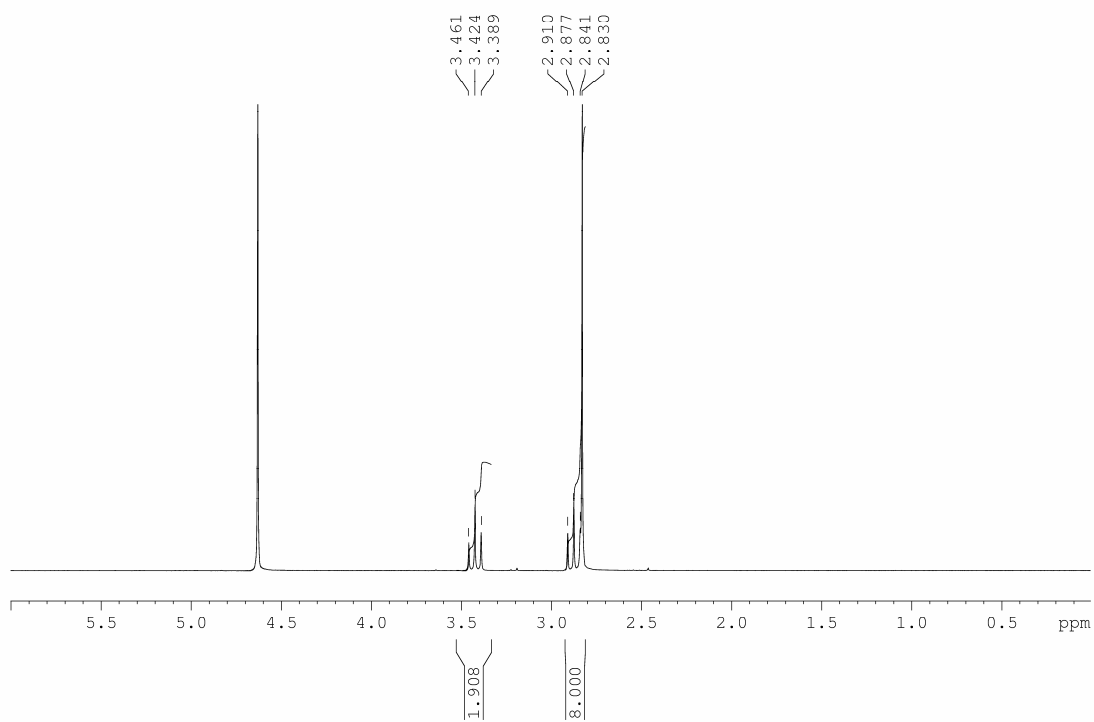
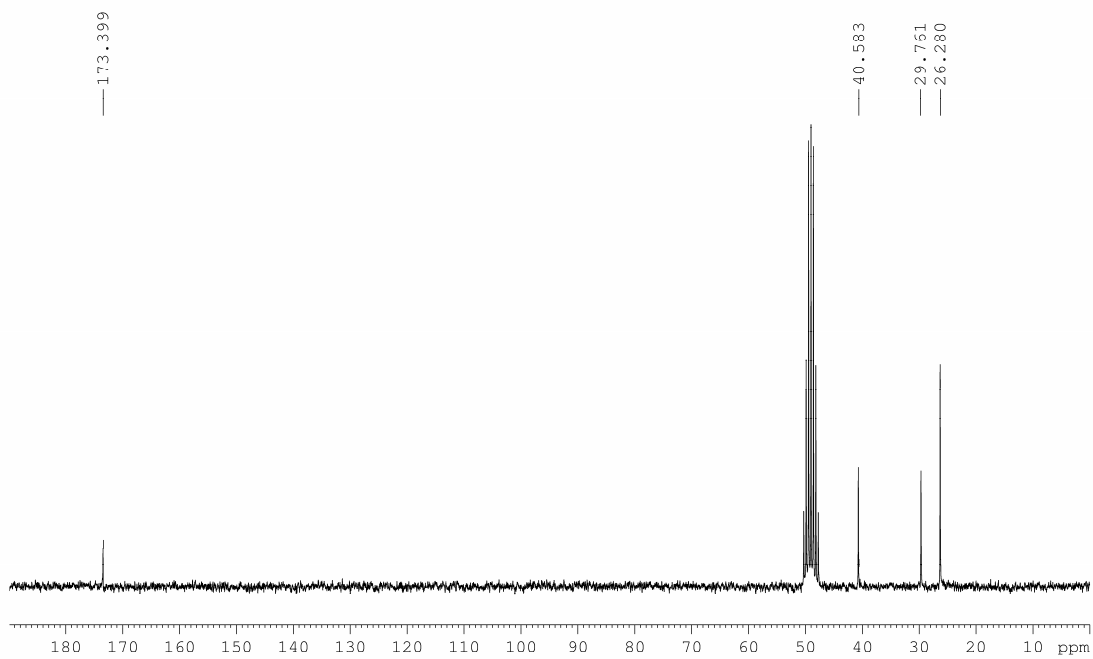
- Riebesell U, Zondervan I, Rost B, Tortell PD, Zeebe RE, Morel FMM: Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* **2000**, 6802, 364-367.
- Riebesell U: Effects of CO₂ enrichment on marine phytoplankton. *J. Oceanogr.* **2004**, 60, 719-729.
- Riebesell U, Bellerby RGJ, Engel A, Fabry VJ, Hutchins DA, Reusch TBH, Schulz KG, Morel FMM: Comment on „Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world”. *Science* **2008**, 322, 1466b.
- van Rijssel M, Gieskes WWC: Temperature, light, and the dimethylsulfoniopropionate (DMSP) content of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). *J. Sea Res.* **2002**, 48, 17-27.
- Ritov VB, Kelley DE, Kagan VE: Derivatization of F₂-isoprostanes with 1-pyrenyldiazomethane and their subsequent determination by fluorescence high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **2002**, 311, 11-18.
- Rodhe W, Vollenweider RA, Nauwerk A: The primary production and standing crop of phytoplankton. In Buzzati-Traverso AA [Ed.] *Perspectives in marine biology*. **1958**, University of California press, 299-322.
- Roenneberg T, Nakamura H, Cranmer LD, Ryan K, Kishi Y, Hastings JW: Gonyauline: A novel endogenous substance shortening the period of the circadian clock of a unicellular alga. *Experientia* **1991**, 47, 103-106.
- Rost B, Riebesell U, Burkhardt S, Sültemeyer D: Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **2003**, 48, 55-67.
- Rost B, Riebesell U: Coccolithophores and the biological pump: Responses to environmental changes. In: Thierstein HR und Young JR [Eds.] *Coccolithophores – From Molecular Processes to Global Impact*. **2004**, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 99-124.
- Roy S: Strategies for the minimisation of UV-induced damage. In De Mora SJ, Demers S, and Vernet M [Eds.] *The Effect of UV Radiation in the Marine Environment*. **2000**, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 177-205.
- Schneede J, Ueland PM: Formation in an aqueous matrix and properties and chromatographic behaviour of 1-pyrenyldiazomethane derivatives of methylmalonic acid and other short-chain dicarboxylic acids. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 315-319.
- Schroeder W, Katz L: The use of silver oxide in the preparation of diaryldiazomethanes. *J. Org. Chem.* **1954**, 19, 718-720.
- Sciuto S, Piatelli M, Chillemi R: (-)-(S)-4-Dimethylsulfonio-2-methoxybutyrate from the red alga *Rytiphloea tinctoria*. *Phytochemistry* **1982**, 21, 227-228.
- Shaw GE: Aerosols as climate regulators: A climate-biosphere linkage? *Atmos. Environ.* **1987**, 21, 985-986.
- Shiraiwa Y: Physiological regulation of carbon fixation in the photosynthesis and calcification of coccolithophorids. *Comp. Biochem. Physiol. B* **2003**, 136, 775-783.

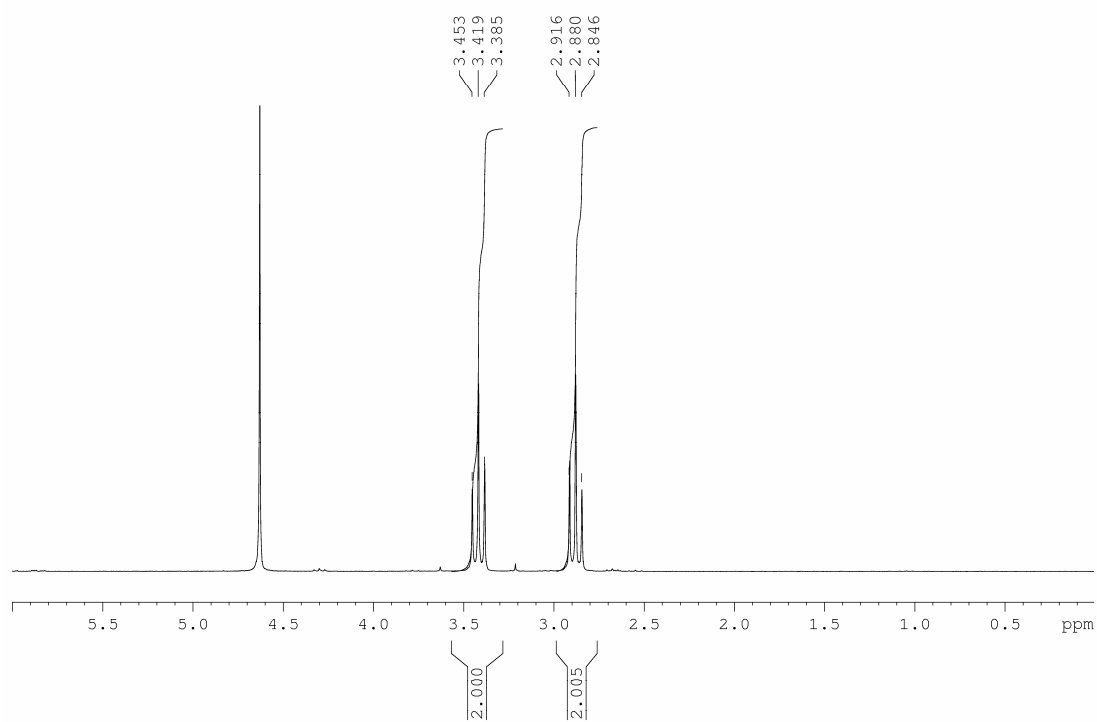
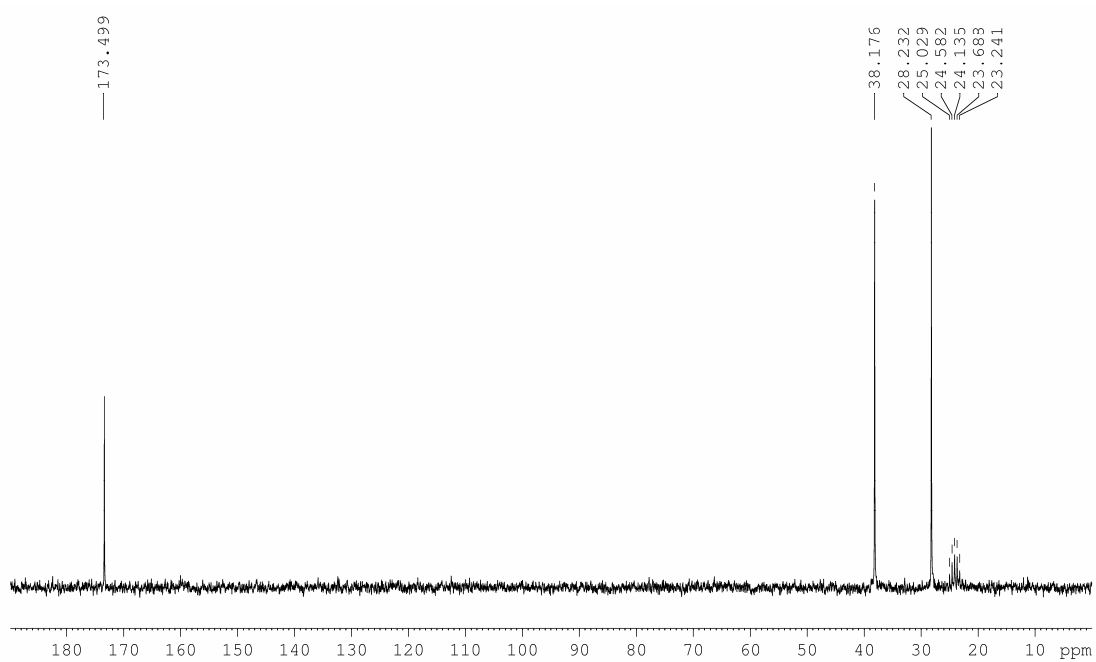
- Simó R, Pedrós-Alió C: Role of vertical mixing in controlling the oceanic production of dimethyl sulphide. *Nature* **1999**, *402*, 396-399.
- Smith GC, Clark T, Knutsen L, Barrett E: Methodology for analyzing dimethyl sulfide and dimethyl sulfoniopropionate in seawater using deuterated internal standards. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5563-5568.
- Sorrosa JM, Satoh M, Shiraiwa Y: Low temperature stimulates cell enlargement and intracellular calcification of coccolithophorids. *Mar. Biotechnol.* **2005**, *7*, 128-133.
- de Souza MP, Yoch DC: Comparative physiology of dimethylsulfide production by dimethylsulfoniopropionate lyase in *Pseudomonas doudoroffii* and *Alcaligenes* sp. strain M3A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3986-3991.
- de Souza MP, Chen YP, Yoch DC: Dimethylsulfoniopropionate lyase from the marine macroalga *Ulva curvata*: purification and characterization of the enzyme. *Planta* **1996**, *199*, 433-438.
- Stefels J, van Boekel WHM: Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species *Phaeocystis* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1993**, *97*, 11-18.
- Stefels J, Dijkhuizen L: Characteristics of DMSP-lyase in *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1996**, *131*, 307-313.
- Stefels J, Gieskes WWC, Dijkhuizen L: Intriguing functionality of the production and conversion of DMSP in *Phaeocystis* sp. In Kiene RP, Visscher PT, Keller MD, Kirst GO [Eds.] *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds.* **1996** Plenum, New York, 305-315.
- Stefels J, van Leeuwe MA: Effects of iron and light stress on the biochemical composition of Antarctic *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). I. Intracellular DMSP concentrations. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 486-495.
- Stefels J: Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *J. Sea Res.* **2000**, *43*, 183-197.
- Stefels J, Steinke M, Turner S, Malin G, Belviso S: Environmental constraints on the production and removal of the climatically active gas dimethylsulphide (DMS) and implications for ecosystem modelling. *Biogeochem.* **2007**, *83*, 245-275.
- Steinke M, Wolfe GV, Kirst GO: Partial characterisation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyase isozymes in 6 strains of *Emiliania huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, *175*, 215-225.
- Steinke M, Malin G, Liss PS: Trophic interactions in the sea: An ecological role for climate relevant volatiles? *J. Phycol.* **2002**, *38*, 630-638.
- Stramski D, Sciandra A, Claustre H: Effects of temperature, nitrogen, and light limitation on the optical properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 392-403.

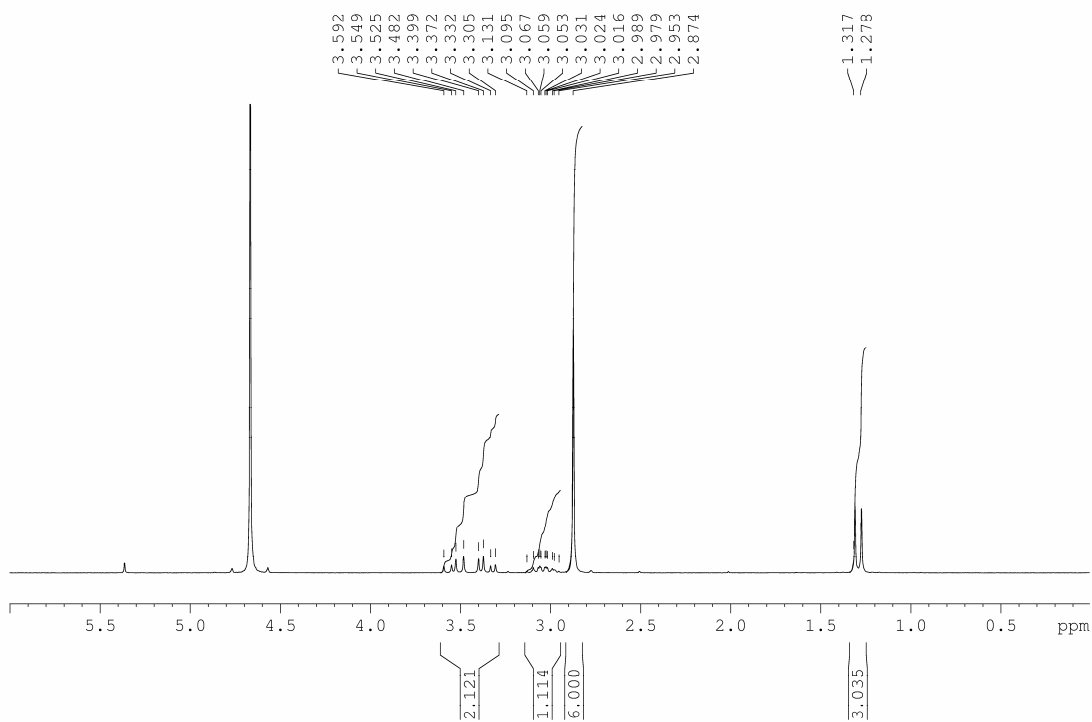
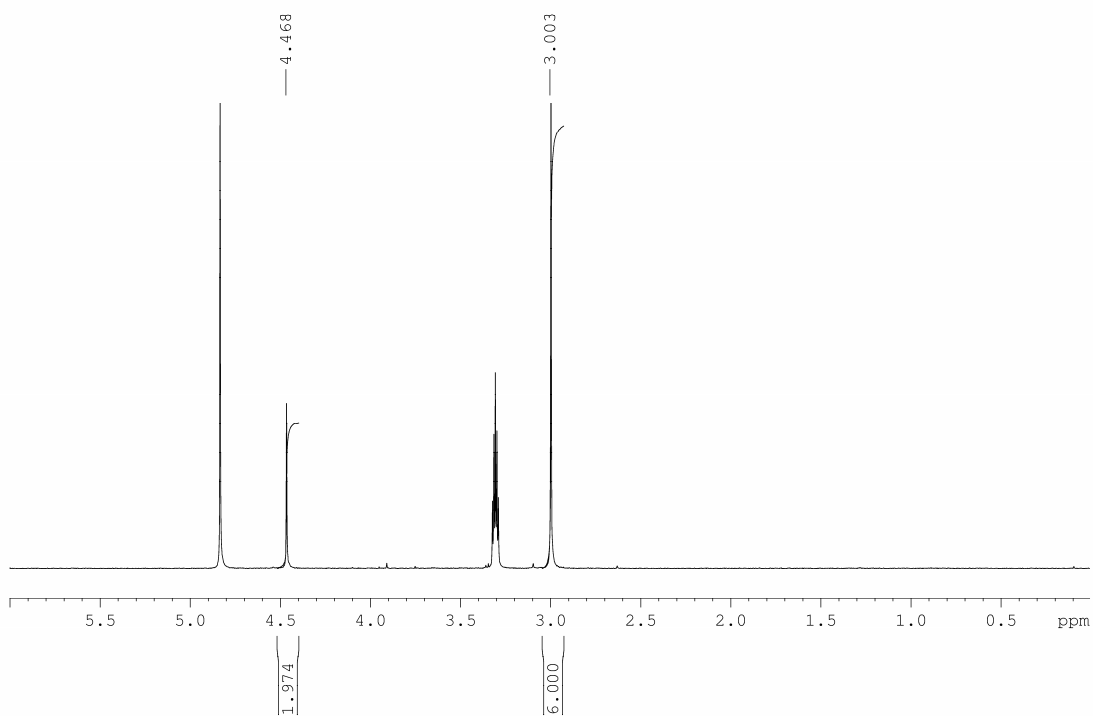
- Strom S, Wolfe G, Slajer A, Lambert S, Clough J: Chemical defense in the microplankton II: Inhibition of protist feeding by β -dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Limnol. Oceanogr.* **2003**, *48*, 230-237.
- Sunda W, Kieber DJ, Kiene RP, Huntsman S: An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* **2002**, *418*, 317-320.
- Sunda WG, Hardison R, Kiene RP, Bucciarelli E, Harada H: The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: Climate feedback implications. *Aquat. Sci.* **2007**, *69*, 341-351.
- Todd JD, Rogers R, Li YG, Wexler M, Bond PL, Sun L, Curson ARJ, Malin G, Steinke M, Johnston AWB: Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science* **2007**, *315*, 666-669.
- Toennies G, Kolb JJ: Methionine studies. VII. Sulfonium derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 849-851.
- Tortell PD, DiTullio GR, Sigman DM, Morel FMM: CO₂ effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2002**, *236*, 37-43.
- Turner SM, Malin G, Liss PS, Harbour DS, Holligan PM: The seasonal variation of dimethyl sulfide and dimethylsulfoniopropionate concentrations in nearshore waters. *Limnol. Oceanogr.* **1988**, *33*, 364-375.
- Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A, Levine A: Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1061-1064.
- Vidoudez C: Diatom Metabolomics. **2010**, Dissertation, Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Vila-Costa M, Simó R, Harada H, Gasol JM, Slezak D, Kiene RP: Dimethylsulfoniopropionate uptake by marine phytoplankton. *Science* **2006**, *314*, 652-654.
- Vogt M, Steinke M, Turner S, Paulino A, Meyerhöfer M, Riebesell U, LeQuéré C, Liss P: Dynamics of dimethylsulphoniopropionate and dimethylsulphide under different CO₂ concentrations during a mesocosm experiment. *Biogeosciences* **2008**, *5*, 407-419.
- Wiese-meier T, Hay M, Pohnert G: The potential role of wound-activated volatile release in the chemical defence of the brown alga *Dictyota dichotoma*: Blend recognition by marine herbivores. *Aquat. Sci.* **2007**, *69*, 403-412.
- Wiese-meier T, Pohnert G: Direct quantification of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in marine micro- and macroalgae using HPLC or UPLC/MS. *J. Chrom. B* **2007**, *850*, 493-498.
- Williams KA, Takahashi Doi J, Kenneth Musker W: Neighboring-group participation in organic redox reactions. 10. The kinetic and mechanistic effects of imidazole and benzimidazole nitrogen on thioether oxidations. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4-10.

- Wilson WH, Turner S, Mann NH: Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effect on DMSP and DMS production. *Estuar. Coast. Shelf Sci. A* **1998**, *46*, 49-59.
- Winder M, Schindler DE: Climate change uncouples trophic interactions in an aquatic ecosystem. *Ecology* **2004**, *85*, 2100-2106.
- Wingenter OW, Haase KB, Zeigler M, Blake DR, Sherwood Rowland F, Sive BC, Paulino A, Thyraug R, Larsen A, Schulz K, Meyerhöfer M, Riebesell U: Unexpected consequences of increasing CO₂ and ocean acidity on marine production of DMS and CH₂ClI: Potential climate impacts. *Geophys. Res. Lett.* **2007**, *34*, L05710.
- Wolfe GV, Steinke M: Grazing-activated production of dimethyl sulfide (DMS) by two clones of *Emiliana huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.* **1996**, *41*, 1151-1160.
- Wolf-Gladrow DA, Riebesell U, Burkhardt S, Bijma J: Direct effects of CO₂ concentration on growth and isotopic composition of marine plankton. *Tellus* **1999**, *51B*, 461-476.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN: Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **1982**, *217*, 1214-1222.
- Yancey PH: Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819-2830.
- Yang GP, Levasseur M, Michaud S, Scarratt M: Biogeochemistry of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the surface microlayer and subsurface water of the western North Atlantic during spring. *Mar. Chem.* **2005**, *96*, 315-329.
- Yassaa N, Colomb A, Lochte K, Peeken I, Williams J: Development and application of a headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of dimethylsulfide emitted by eight marine phytoplankton species. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **2006**, *4*, 374-381.
- Yoch DC, Ansedé JH, Rabinowitz KS: Evidence for intracellular and extracellular dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyases and DMSP uptake sites in two species of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3182-3188.
- Yoch DC: Dimethylsulfoniopropionate: Its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5804-5815.
- Young JR: Possible functional interpretations of coccolith morphology. *Abh. Geol. B.-A.* **1987**, *39*, 305-313.
- Zhang J, Nagahama T, Abo M, Okubo A, Yamazaki S: Capillary electrophoretic analysis of dimethylsulfoniopropionate in sugarcane and marine algal extracts. *Talanta* **2005**, *66*, 244-248.
- Zhang JZ, Fischer CJ: A simplified resorcinol method for the direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater. *Mar. Chem.* **2006**, *99*, 220-226.

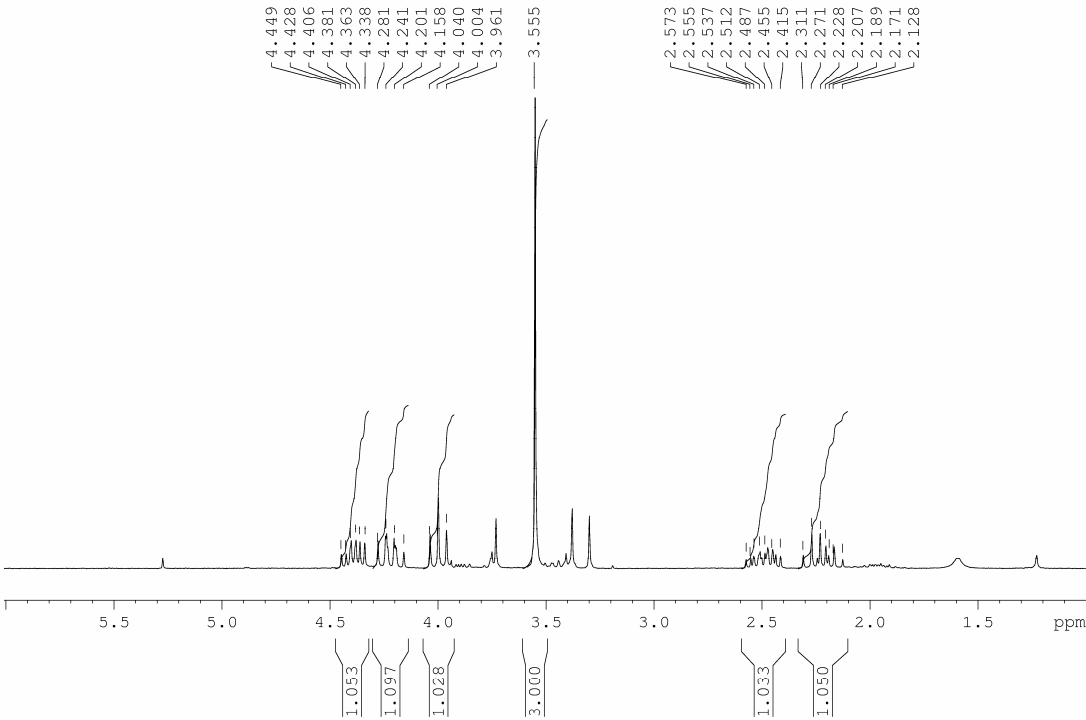
Anhang

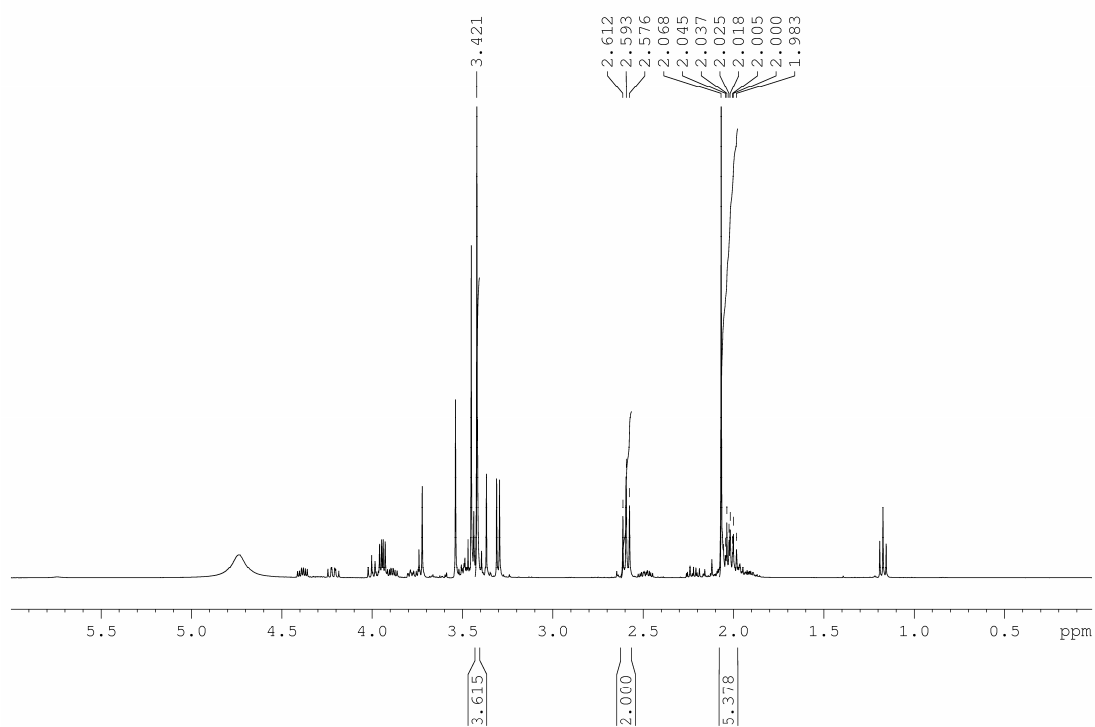
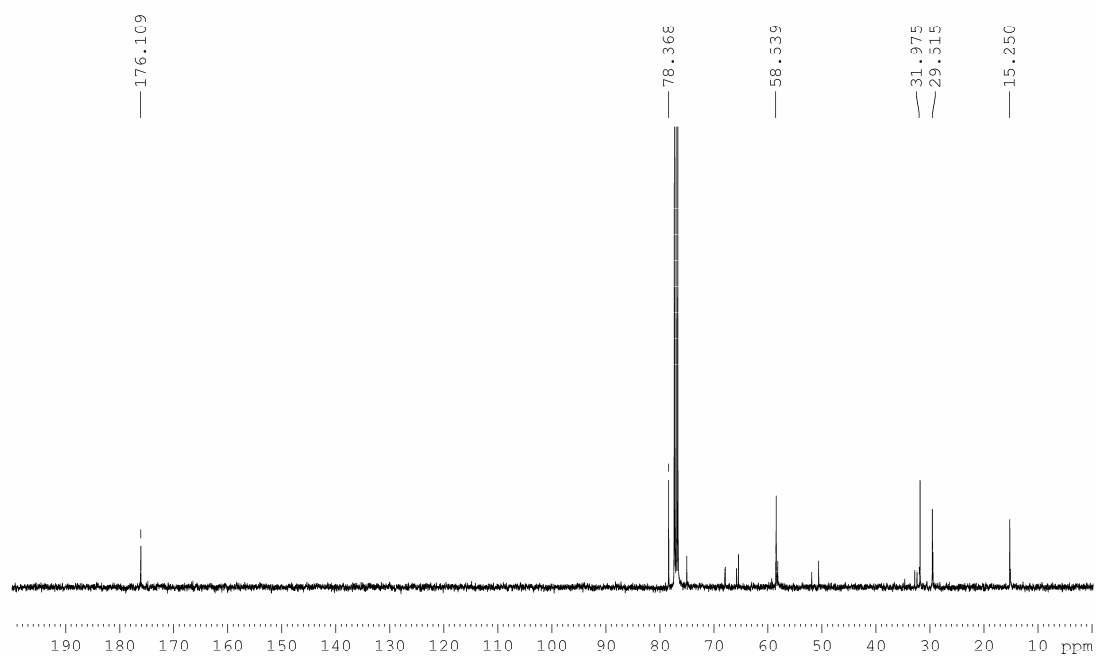
 $^1\text{H-NMR}$ DMSP*HCl in D_2O , 200 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ DMSP*HCl in D_2O , 50 MHz

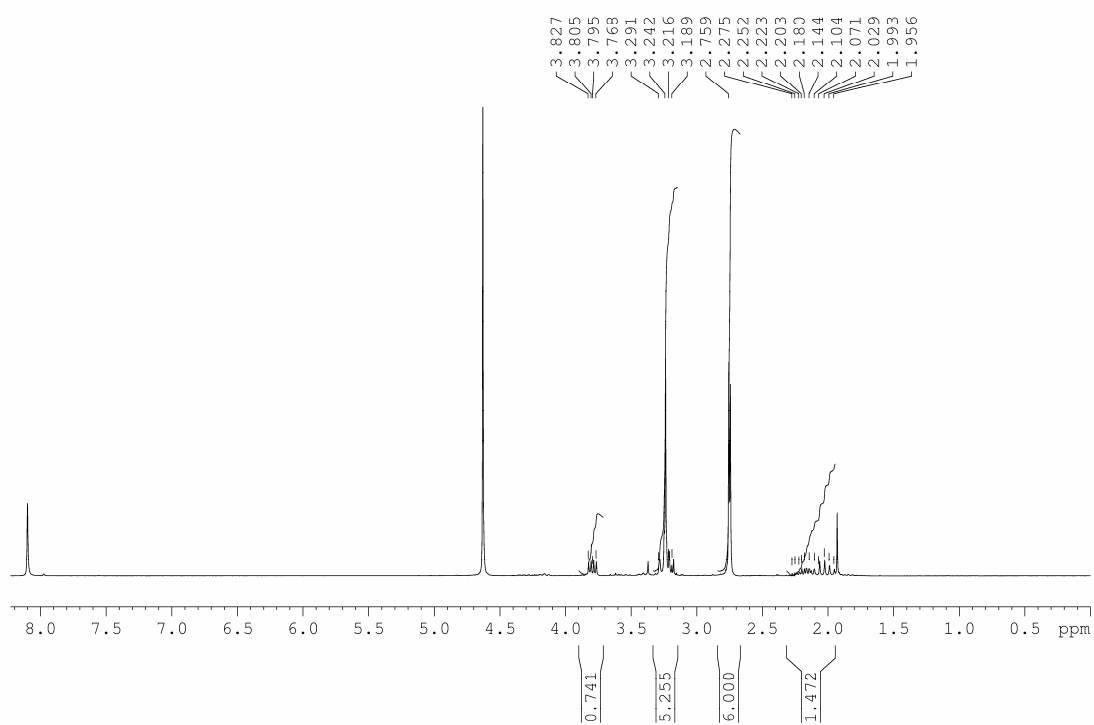
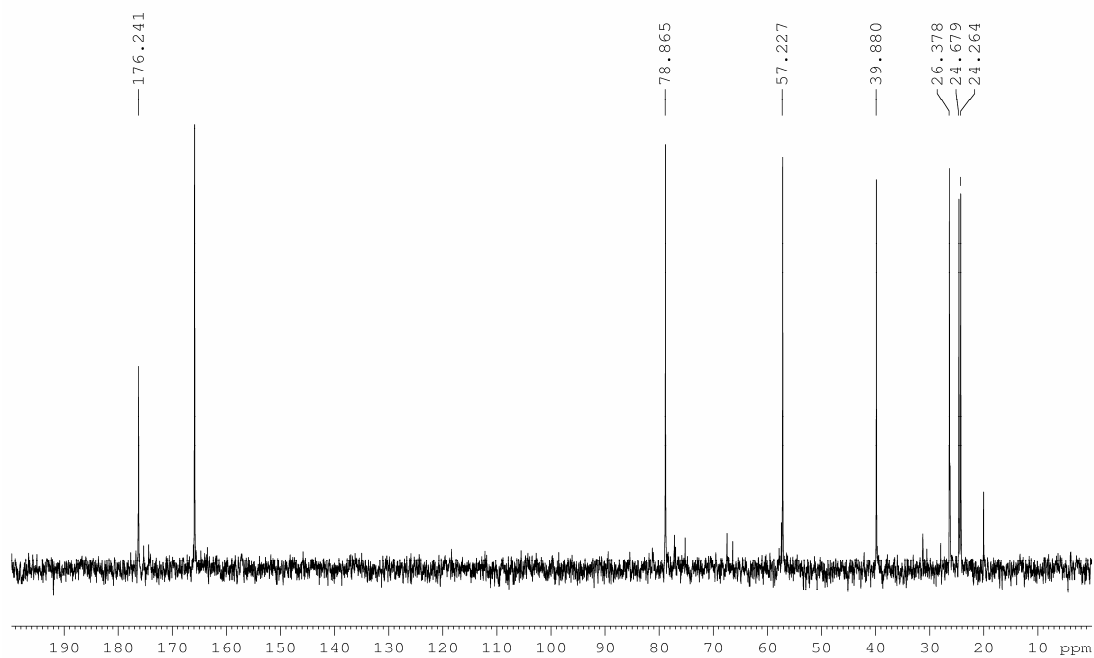
$^1\text{H-NMR}$ $\text{D}_6\text{-DMSP*HCl}$ in D_2O , 200 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ $\text{D}_6\text{-DMSP*HCl}$ in D_2O , 50 MHz

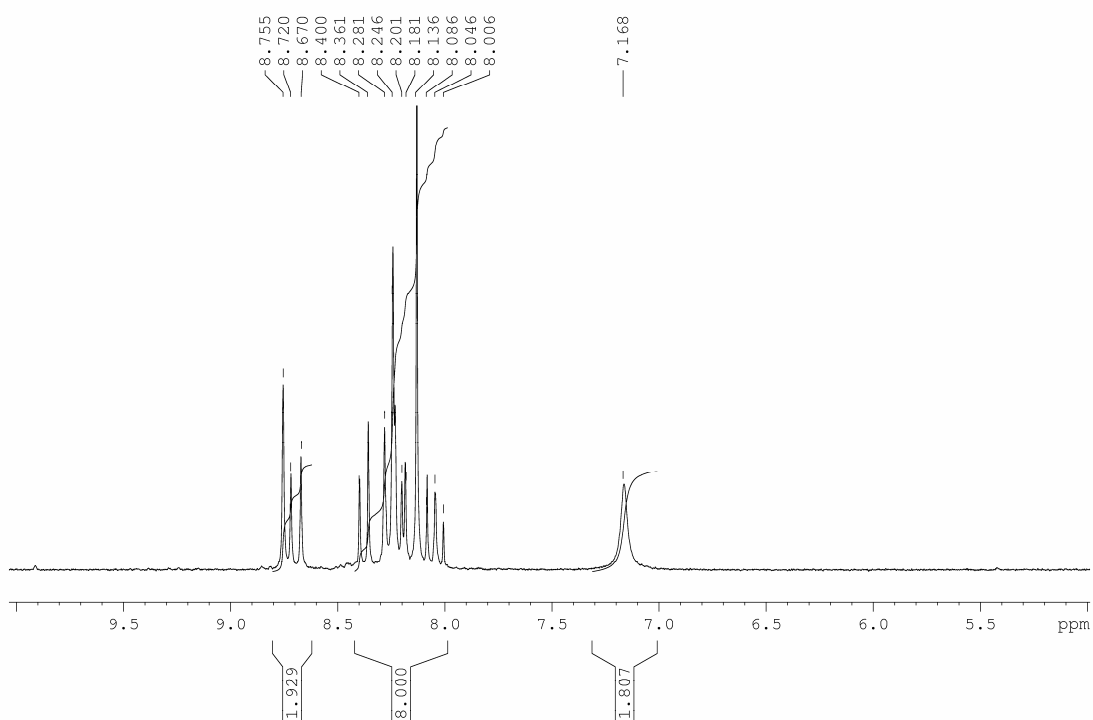
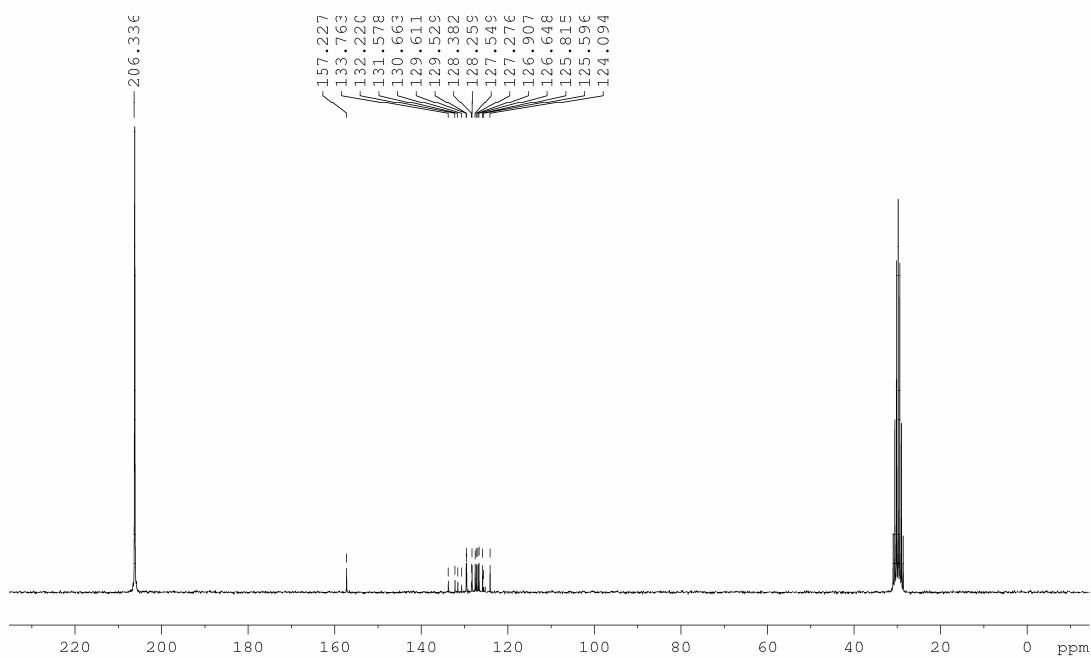
$^1\text{H-NMR}$ DMS-2-MP in D_2O , 200 MHz $^1\text{H-NMR}$ DMS-Acetat in $\text{MeOH} [\text{D}_4]$, 200 MHz

¹H-NMR α-Methoxy-γ-butyrolacton in CDCl₃, 200 MHz

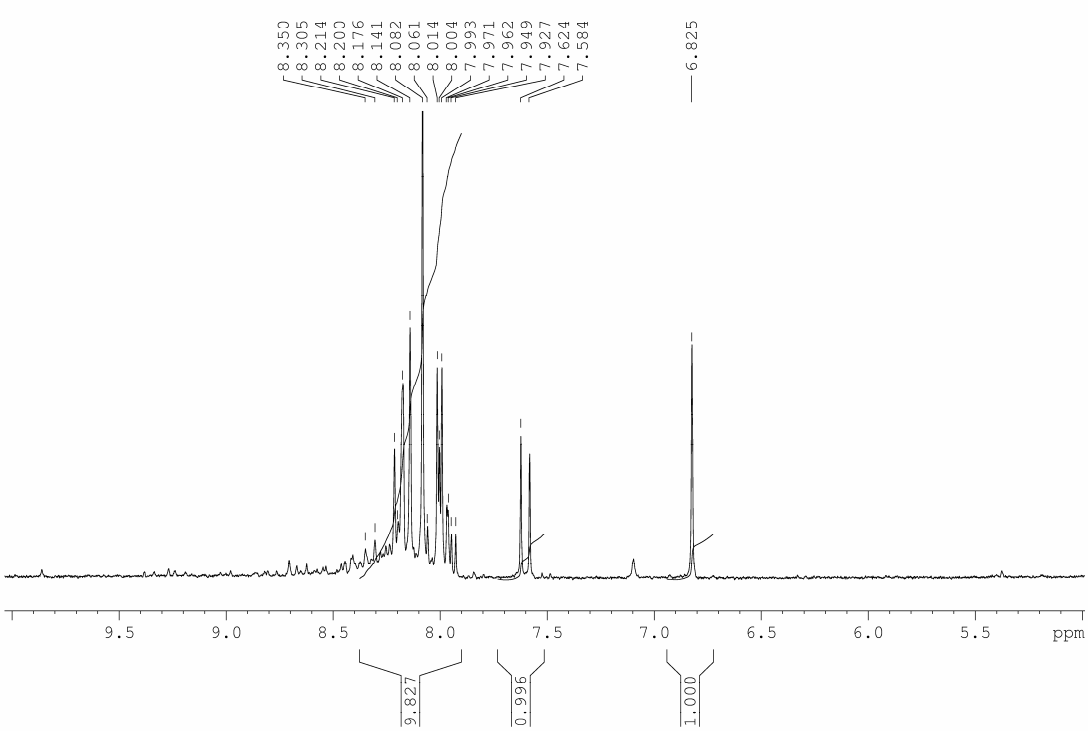


$^1\text{H-NMR}$ 4-Methylthio-2-methoxybuttersäure in CDCl_3 , 400 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ 4-Methylthio-2-methoxybuttersäure in CDCl_3 , 100 MHz

$^1\text{H-NMR}$ 4-Dimethylsulfonium-2-methoxybutyrat*HI in D_2O , 200 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ 4-Dimethylsulfonium-2-methoxybutyrat*HI in D_2O , 50 MHz

$^1\text{H-NMR}$ 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazon in DMSO $[\text{D}_6]$, 200 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ 1-Pyrenicarboxaldehyd Hydrazon in DMSO $[\text{D}_6]$, 50 MHz

¹H-NMR 1-Pyrenyldiazomethan in DMSO [D₆], 200 MHz



Danksagung

Als ich vor dreieinhalb Jahren mit meiner Doktorarbeit begonnen habe, wurde mir gesagt: „Du wirst aus der Doktorarbeit anders rausgehen als du reinkommen bist.“ Damals wusste ich nicht so recht, was ich mit diesem Satz anfangen sollte. Heute, um einige Erfahrungen reicher, verstehe ich ihn umso besser.

Auch wenn die Arbeit von mir durchgeführt und verfasst wurde, so haben mir doch viele, viele Leute im Hintergrund geholfen. Bei diesen Personen möchte ich hier danken und bitte alle, die ich nicht erwähne, um Verständnis.

Als erstes gilt mein größter Dank Prof. Dr. Pohnert für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen. Danke für die Unterstützung, die Hilfe und die zahlreichen guten Ratschläge in allen Situationen, die meine Arbeit für mich parat hielt!

Danke an meine Familie! Danke, dass ich meinen Weg als Chemikerin gehen kann, aber auch immer wieder zurückkommen darf!

Danke an die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die Förderung durch das Stipendiatenprogramm, die damit verbundene finanzielle Unabhängigkeit und die (unterhaltsamen wie lehrreichen) Stipendiatenseminare.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe. Danke für das angenehme Umfeld (beruflich wie privat), dass ihr mir geboten habt!

Danke an Dr. Charles Vidoudez, dass er sein umfangreiches Wissen aus dem Bereich der Biologie mit mir geteilt hat. Ohne seinen Erfindergeist bezüglich apparativer Improvisation wären einige Experimente sicherlich nicht so möglich gewesen. Und ohne ihn wären die zahlreichen Stunden im MS-Raum sicherlich trister gewesen.

Danke an Dr. Matthew Welling für seine hilfreiche Einführung in unsere UPLC/MS und die Erkenntnis, dass auch ein Hammer ein filigranes Werkzeug sein kann.

Danke an Dr. Jerrit Weißflog für seine ermunternden Kommentare bei meinen Synthesen („Ja, es ist rot.“) und den regen Austausch an Filmzitate während des Einwiegens diverser Standards.

Danke an Dr. Thomas Wichard für manchmal stundelange, aber immer hilfreiche und unterhaltsame Diskussionen über diese Arbeit (oder Mannschaftsaufstellungen oder kreative

Namensgebung...). Und danke für diverse wertvolle Arbeitsweisen („Das geht jetzt ganz schnell!“ „Das wird!“).

Danke an Dr. Emily Prince und Dr. Jennifer Sneed für die Geduld beim Korrekturlesen meiner Veröffentlichungen.

Danke an Dr. Alexandra Barofsky für die unterhaltsame Zeit bei der Mesokosmos-Studie und bei der damit verbundenen Autofahrt.

Danke an Jan Grüneberg und Andrea Bauer für den unermüdlichen Einsatz am Perkin Elmer GC. Danke an Carsten Paul für kritische, aber vor allem hilfreiche Diskussionen vor, während und nach den Experimenten. Ihm zusammen mit Tino Jaschinski und Steven Oppenhäuser danke ich für das ewige Kicker-Duell „Chemiker gegen Ernährungswissenschaftler“ als Abwechslung zu den zahlreichen Stunden am Mikroskop. Und in diesem Zusammenhang auch ein herzliches Dankeschön an Tino für die vielen wichtigen Sätze, die er in unserer Arbeitsgruppe etabliert hat („Auf geht's!“).

Danke an Kristina Hitzfeld für eine abwechslungsreiche Zeit während ihrer Diplomarbeit in meinem Labor und ihrer Mitarbeit bei der Entwicklung der GC/MS-Methode. Vor allem aber danke für einige unvergessliche Situationen auf Helgoland.

Danke an Björn Gebser für die sehr amüsante Zeit im Labor, die angenehme Zusammenarbeit (es ging auch ohne Eisenstange) und das milde Kartoffelklima. Und natürlich danke für die vielen Synthesestunden, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke an Hannes Richter für die Hilfe (und das Durchhaltevermögen) bei den Nährstoffanalysen.

Danke an alle Arbeitsgruppenmitglieder, die mir durch 9 Tage und 8 Nächte Laborarbeit trotz meines großen Schlafdefizits zur Seite gestanden haben (vor allem Andrea und Katha!).

Danke Björn Gebser, Martin Rempt und Phillipp Richter für die Erkenntnis, dass es zu jeder Lebenssituation mindestens ein passendes Simpsons-Zitat gibt.

Danke an Caroline Kurth für das Korrekturlesen meiner Arbeit und einige hilfreiche Ratschläge diesbezüglich. Danke an Katharina Grosser, Michaela Mausz und Andrea Bauer für die regelmäßige Versorgung mit meiner liebsten Nuss-Nougat-Creme (vor allem in den letzten Wochen meiner Arbeit).

Danke!

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Astrid Spielmeier
Geburtsdatum	05.07.1983
Geburtsort	Ostercappeln
Nationalität	Deutsch

AUSBILDUNG

10/2007 – 06/2011	Doktorand an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Institut für Anorganische und Analytische Chemie Arbeitsgruppe Prof. Pohnert
01/2008-12/2010	Stipendiat der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU)
07/2007	Abschluss des Chemiestudiums (Chemie/Umweltchemie) mit Diplom
10/2005	Hochschulwechsel an die Friedrich-Schiller-Universität Jena Fortsetzung des Chemiestudiums im Studiengang „Umweltchemie“
10/2002 - 09/2005	Chemiestudium (TU Bergakademie Freiberg)
06/2002	Abitur, Ursulaschule, Osnabrück

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

Lehrtätigkeit:

Praktikumsbetreuer an der Friedrich-Schiller-Universität Jena 2007 - 2010
(Spektrophotometrie, Spektroskopie (UV/Vis, IR, Fluoreszenz), Strukturaufklärung)
Betreuung von Diplomanden (2008 - 2010)

Feldstudien:

Mesokosmos-Studien in Bergen, Norwegen (April 2008)

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena,

Astrid Spielmeier